

Karlova Univerzita v Praze

Přírodovědecká fakulta

Antropologie a genetika člověka



Bc. Eva Fárková

**Role microRNA v patogenezi těhotenských komplikací souvisejících s
placentární insuficiencí**

**The role of microRNAs in pathogenesis of placental insufficiency –
related pregnancies**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne 24. 4. 2014

Podpis

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. za cenné připomínky a odborné vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegyním z laboratoře, které se podílely na prvotním zpracování biologického materiálu. Zvláštní poděkování patří Mgr. Kateřině Kotlabové za rady a spolupráci v experimentální části práce.

Výzkum byl prováděn na Univerzitě Karlově v Praze, na 3. lékařské fakultě. Financován byl z grantů PRVOUK P32 a SVV 260041/2014.

Abstrakt

MicroRNA (miRNA) patří do skupiny krátkých nekódujících RNA o rozsahu 18 – 25 nukleotidů, které regulují genovou expresi posttranskripčně. Některé z miRNA disponují tkáňově specifickou funkcí. Předpokladem práce je, že některé miRNA a rozdíly v míře jejich exprese mohou být charakteristické pro těhotenské komplikace související s placentární insuficiencí a zároveň pro onemocnění kardiovaskulárního systému.

Míra genové exprese 32 kardiovaskulárních miRNA byla sledována ve dvou typech biologického materiálu – placentární tkáni a periferní krvi matky, a to u pacientek s klinicky manifestovanou preeklampií (PE), gestační hypertenzí (GH) a intrauterinní růstovou retardací (IUGR), které byly srovnávány se vzorky fyziologických gravidit (FG). Celkem bylo zpracováno 127 vzorků z placentárních tkání v zastoupení 20 FG, 20 GH, 20 IUGR, 67 PE a 80 vzorků z periferní krve, z toho 20 FG, 20 GH, 20 IUGR, 20 PE. Před samotným výzkumem proběhly dvě pilotní studie pro výběr endogenních kontrol pro normalizaci dat genové exprese v obou typech biologického materiálu. Detekce a kvantifikace probíhala prostřednictvím kvantitativní PCR v reálném čase. Na souboru placentárních tkání bylo identifikováno několik miRNA, které vykazovaly zvýšené hladiny u GH v porovnání s FG (miR-1, miR-16, miR-17, miR-20a, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-26a, miR-100, miR-126, miR-130b, miR-133a, miR-143, miR-146a, miR-155, miR-181a, miR-210, miR-499, miR-574-3p). Up-regulace dvou miRNA byla také prokázána u PE v porovnání s FG (miR-210 a miR-499). V případě IUGR nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. V placentární tkáni byla prokázána up-regulace miR-210 a miR-499 u závažné formy PE, a up-regulace miR-499 u mírné formy PE. Ženy s PE, které rodily po 34. týdnu gravidity, měly ve vzorcích placentární tkáně vyšší hladiny miR-1, miR-17, miR-20a, miR-155, miR-210, miR-499. V případě PE nasedající na předchozí hypertenzi byla prokázána up-regulace miR-499 a u vzorků PE bez předchozí hypertenze byla prokázána up-regulace miR-210 a miR-499. Soubor dat na plné periferní krvi poukázal na down-regulaci miR-20a, miR-21, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-100, miR-103, miR-126, miR-143, miR-146a, miR-195, miR-199a, miR-221, miR-342-3p, miR-574-3p u PE a down-regulaci miR-199a u IUGR.

Výsledky práce naznačují, že výše zmíněné miRNA, které se podílejí na řízení funkcí kardiovaskulárního systému, by se mohly rovněž uplatňovat i v patogenezi těhotenských komplikací, čehož by mohlo být využito v klinické praxi.

Klíčová slova: microRNA, kvantitativní PCR v reálném čase, kardiovaskulární onemocnění, preeklampsie, gestační hypertenze, intrauterinní růstová retardace

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs of length ranging from 18 to 25 nucleotides that regulate gene expression at posttranscriptional level. Expression of some miRNAs is tissue specific. This task assumed that placental insufficiency related pregnancy complications may be characterised by the dysregulation of microRNAs that are crucial for the regulation of cardiovascular system and cardiovascular diseases.

The gene expression of 32 cardiovascular miRNAs was studied in two types of biological material - placental tissue and maternal whole peripheral blood. Patient cohort of clinically manifested preeclampsia (PE), gestational hypertension (GH) and intrauterine growth restriction (IUGR) was compared with samples derived from normal pregnancies (FG). In total, 127 placental tissue samples (20 FG, GH 20, 20 IUGR , 67 PE) and 80 maternal whole peripheral blood samples (20 FG, GH 20, 20 IUGR , 20 PE) were processed. Before the research, two pilot studies focused on the selection of endogenous controls for data normalization of gene expression in both types of biological material were performed. Detection and quantification was carried out by quantitative real-time PCR. In a group of placental tissue several miRNAs showed elevated levels in GH (miR-1, miR-16, miR-17, miR-20a, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-26a, miR-100, miR-126, miR-130b, miR-133a, miR-143, miR-146a, miR-155, miR-181a, miR-210, miR-499, miR-574-3p) and up-regulation in PE (miR-210 and miR-499) when compared with FG. The difference between IUGR and FG was not found as statistical significant. The placental tissue showed up-regulation of miR-210 and miR-499 in severe PE. In case of mild forms of PE miR-499 was up-regulated. The term birth after 34th week of gestation showed placental tissue samples overexpression of miR-1, miR-17, miR-20a, miR-155, miR-210, miR-499. Elevated levels of miR-499 were detected in PE with previous occurrence of gestational hypertension. Up-regulation of miR-210 and miR-499 was detected in PE without previous hypertension. Maternal whole peripheral blood showed down-regulation of miR-20a, miR-21, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-100, miR-103, miR-126, miR-143, miR-146a, miR-195, miR-199a, miR-221, miR-342-3p, miR-574-3p in samples of PE and down-regulation of miR-199a in IUGR when compared with FG.

Results of this study suggest that the above- mentioned miRNAs that significantly contribute to the regulation of cardiovascular system may be involved in pathogenesis of pregnancy related complications, and may be used in clinical practice.

Key words: microRNA, quantitative real-time PCR, cardiovascular diseases, preeclampsia, gestational hypertension, intrauterine growth restriction

Obsah

Seznam zkratk	9
1. Úvod	11
2. MicroRNA	13
2.1. Historie	14
2.2. Kardiovaskulární miRNA	15
3. Těhotenské komplikace	17
3.1. Preeklampsie	17
3.1.1. Klasifikace a diagnostika preeklampsie	18
3.2. Gestační hypertenze	20
3.3. Fetální růstové poruchy	21
4. Kardiovaskulární onemocnění	24
4.1. Mozková mrtvice	25
4.2. Infarkt myokardu	25
4.3. Ischemická choroba srdeční	27
4.4. Idiopatická hypertenze	28
4.5. Onemocnění žil	28
4.6. Diabetes mellitus	29
5. Cíle práce	31
6. Materiál	32
7. Metody	34
7.1. Definování zahrnutých diagnóz	34
7.2. Zpracování biologického materiálu	34
7.3. Izolace RNA obohacenéo krátké RNA molekuly z placentární tkáně	35

7.4. Izolace RNA obohacené o krátké RNA molekuly z plné krve matky	36
7.5. Měření koncentrace RNA	36
7.6. Reverzní transkripce.....	37
7.7. Kvantitativní PCR v reálném čase	38
7.8. Analýza dat pomocí statistických metod.....	41
8. Výsledky.....	43
8.1. Výsledky - placentární tkáň	44
Grafy č. 1 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni. Skupinová analýza genové exprese mezi jednotlivými diagnózami. A-B	49
8.2. Výsledky – plná periferní krev matky.....	51
9. Diskuze	58
10. Závěr	62
Seznam literatury	64
Internetové zdroje.....	73
Přílohy.....	74

Seznam zkratek

ACOG	Americké kolegium gynekologie a porodnictví (American College of Obstetrics and Gynecology)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegant</i> (Háďátko obecné), půdní červ užívaný jako modelový organismus
Ct	prahová hodnota (threshold cycle)
CVD	onemocnění kardiovaskulárního systému
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus prvního typu
DM2	diabetes mellitus druhého typu
EDTA	ethylenditetramin
EL	pufr EL, určený k lýze erytrocytů
FG	fyziologická gravidita
FGR	fetální růstová retardace (fetal growth restriction)
GDM	gestační diabetes mellitus
GH	gestační hypertenze
HELLP	syndrom vyznačující se hemolýzou, zvýšeným množstvím jaterních enzymů v krvi a sníženým počtem krevních destiček (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low platelets)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IUGR	intrauterinní růstová retardace
IUI	umělé oplodnění v těle matky (in utero insemination)
IVF	umělé oplodnění mimo tělo matky (in vitro fertilization)

LBW	nížká porodní hmotnost (low birth weight)
miRISC	komplex RNA tlumící genovou expresi (RNA induced silencing complex)
miRNA	microRNA
PBS	fosfátový pufovaný fyziologický roztok
PE	preeklampsie
PK	periferní (žilní) krev
RLT	pufr RLT k lýze buněk a tkání před izolací RNA
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
SGA	konstitučně malý plod/ novorozenec (small for gestational age)

1. Úvod

Prenatální diagnostika prošla v posledních několika letech velkým rozvojem. Metody k diagnostikování těhotenských komplikací a poruch vývoje plodu lze rozlišit na invazivní a neinvazivní. Invazivní metody prenatální diagnostiky zahrnují biopsii choriových klků, amniocentézu a kordocentézu (Bianchi, 2004). K využití těchto metod se přistupuje v těchto případech (Bianchi *et al.*, 1997):

- matce je více než 35 let,
- matka již porodila dítě s chromozomální aberací či vrozenou vývojovou vadou,
- matka prodělala alespoň jeden spontánní potrat či patologický průběh předchozího těhotenství,
- matka měla problém s otěhotněním,
- na ultrazvuku byly nalezeny zvýšené hodnoty nuchální translucence,
- biochemický screening v prvním a druhém trimestru byl pozitivní.

Celkově se dá říci, že invazivní metody prenatální diagnostiky jsou velmi stresující nejen pro matku, ale především pro plod a hrozí i přímé riziko potratu (Go *et al.*, 2010).

Neinvazivní typ diagnostiky se rozvinul zejména díky ohromnému pokroku v molekulární biologii v posledních několika letech. Ve většině případů neinvazivní metody nahrazují postupně metody invazivní. Podle posledních trendů se přistupuje se k aplikaci invazivních metod pouze v případě, kdy neinvazivní techniky nemohou poskytnout spolehlivý výsledek vyšetření.

Zásadním mezníkem pro rozvoj neinvazivních metod byl objev přítomnosti genetické informace, volné nukleové kyseliny plodu, v krevním oběhu matky (Lo *et al.*, 1997). Systém neinvazivních metod je založen na fenoménu fetálního mikrochimérismu, díky němuž je možné detekovat genetickou informaci plodu v mateřské cirkulaci, přičemž tuto informaci lze v krvi matky zaznamenat přibližně ve 4. týdnu těhotenství (Klonisch and Drouin, 2009).

Fenomén fetálního mikrochimérismu vychází z propustnosti placenty oběma směry. Není propustná pouze ve směru plod – matka, ale také matka – plod (první varianta je zaznamenávána v mnohem větší míře). Díky této schopnosti lze neinvazivně (odběrem periferní krve matky) určit pohlaví plodu – popřípadě vyloučit na pohlaví vázané choroby (hemofilie typu A, B, Duchenneova muskulární dystrofie, Brutonova agamaglobulinémie a další), dále lze stanovit Rh faktor plodu (Lo *et al.*, 1998). Později přispěl k oboru neinvazivní prenatalní diagnostiky objev placentárně specifických microRNA v periferní krvi matky (Chim *et al.*, 2008).

Placenta a její funkce jsou zcela zásadní pro celou etapu těhotenství. Placenta je specifickým orgánem zajišťující přežití plodu v těle matky. Jejím smyslem je zajistit komunikaci mezi plodem a organismem matky, a to po stránce výživy, dýchání a hormonální produkce. Pokud je funkce placenty omezená, dojde k rozvoji těhotenských komplikací, mezi něž patří preeklampsie (PE), fetální růstové retardace (FGR) a další. Během těhotenství placenta uvolňuje do těla matky apoptotická tělíska placentárního trofoblastu obsahující extracelulární nukleové kyseliny, které je díky novým technologiím možné detekovat v krevním oběhu matky (Bianchi, 2004). Zvýšené koncentrace extracelulárních nukleových kyselin v krevním oběhu matky jsou považovány za ukazatele abnormalit ve funkci placenty (Artlett, 2005).

Shrneme-li to, existence miRNA může přinést mnoho důležitých informací nejen o průběhu těhotenství. Přínosem miRNA se budu zabývat v dalších kapitolách, protože právě jejich role v placentární insuficienci bude pravděpodobně v budoucnu velmi stěžejní pro neinvazivní gynekologicko – porodnickou praxi. V mé diplomové práci se zaměřím na rozdíly v genové expresi miRNA mezi fyziologicky a patologicky probíhající graviditou.

2. MicroRNA

MikroRNA (dále jen miRNA) patří do skupiny krátkých nekódujících RNA, obsahují malý počet nukleotidů – mezi 18 a 25 páry bází. Vznikají kaskádou dějů ze základních vláseňkových transkriptů a jsou součástí komplexu miRISC v cytoplazmě buňky. Komplexy miRISC jsou typické utlumováním exprese genů prostřednictvím jejich navázání na 3'UTR oblast (untranslated region), která ovlivňuje procesy v organismu. Primární funkcí miRNA je regulace genové exprese klíčových biologických dějů na posttranskripční úrovni blokadou nebo útlumem translace messenger RNA (mRNA), (Lai, 2002; Bartel, 2004). V lidském genomu bylo zaznamenáno již více než 1800 miRNA (www.mirbase.org, 24. 3. 2014). Díky tomu, že ovlivňují translaci proteinů, jsou miRNA dobrými regulátory mnoha biologických procesů (van Empel *et al.*, 2012). Jedna miRNA může regulovat jeden nebo více genů, exprese jednoho genu může být současně ovlivňována různými miRNA (Collares *et al.*, 2013).

Genová exprese miRNA je v některých případech tkáňově specifická, popřípadě omezená pouze na určité období nebo stav organismu (Liang *et al.*, 2007). Dle studií z posledních let mají miRNA zásadní funkci v prenatálním vývoji. Některé typy miRNA ovlivňují genovou expresi proteinů v lidské placentě (Enquobahrie *et al.*, 2011; Higashijima *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2009; Ishibashi *et al.*, 2012; Maccani *et al.*, 2010; Mayor-Lynn *et al.*, 2011; Noack *et al.*, 2011; Pineles *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009). V klinických studiích lze zkoumat souvislost mezi placentárně specifickými miRNA a těhotenskými komplikacemi. Z tohoto hlediska by bylo možné považovat miRNA za biomarkery těhotenských komplikací (Chim *et al.*, 2008; Hromadníková *et al.*, 2012; Kotlabová *et al.*, 2011; Rosenfeld *et al.*, 2008).

Placentární miRNA jsou během těhotenství uvolňovány do krevního oběhu matky a lze je tak detekovat v periferní krvi. Jejich hladiny postupně narůstají s progresí gravidity a u jedinců bez známek těhotenství jsou detekovatelné pouze v minimálním množství. Dlouhodobým cílem výzkumu je nalezení vhodných diagnosticko-prognostických markerů pro závažné těhotenské komplikace s jejich možnou včasnou predikcí, tj. v prvním trimestru gravidity.

Aby bylo možné považovat miRNA za relevantní biologický marker, musí splňovat několik kritérií. V první řadě by měla být detekce takového markeru možná některou z neinvazivních metod, která by byla dostatečně citlivá pro danou patologii, kterou chceme predikovat. Zároveň by detekce měla být možná ještě před klinickou manifestací onemocnění, čímž by bylo možné zajistit včasnou léčbu. Hodnoty, které vystihují přítomnost patologie by se měly po nastolení léčby měnit a reflektovat aktuální stav organismu.

2.1. Historie

První důkaz o existenci cirkulujících nukleových kyselin v krevním oběhu, přesněji v krevní plazmě, podali P. Mandel a P. Metais v již v roce 1948. Jejich výsledky však byly ještě několik let přehlíženy, až podstatně později se ukázalo, že by jejich objev mohl změnit prenatální diagnostiku a nahradit velmi rizikové invazivní metody, jakými jsou amniocentéza, biopsie choriových klků nebo kordocentéza (Hung *et al.*, 2009). V roce 1997 Lo a kol. zjistili, že v krevním oběhu matky cirkuluje mužská fetální DNA (Lo *et al.*, 1997). Jejich zjištění odstartovalo rychlý rozvoj prenatálních neinvazivních diagnostických metod, kdy k určení pohlaví či Rh faktoru a dalších informací o plodu postačí několik mililitrů krve matky.

V roce 1993 byly poprvé objeveny miRNA a byla prokázána možnost je detekovat u mnoha živočišných druhů včetně člověka (Nature Publishing Group, 2002). Následující výzkumy potvrdily roli miRNA v genezi nejen mnoha orgánů, ale i nádorů. Do budoucna bude jistě možné za pomoci rychle se rozvíjejících metod, jakými je například kvantitativní PCR v reálném čase, využívat konkrétní miRNA jako biomarkery určitých chorob (Chen *et al.*, 2005). Klíčovým objevem pro gynekologii se stala identifikace placentárně specifických miRNA, které placenta v průběhu těhotenství uvolňuje do krevního oběhu matky (Chim *et al.*, 2008; Hromadníková *et al.*, 2010; Kotlabová *et al.*, 2011). Následovaly výzkumy zjišťující míru exprese miRNA v těhotenství s normálním průběhem ve srovnání s těhotenstvím s vybranými komplikacemi (Hromadníková *et al.*, 2012 a 2013).

2.2. Kardiovaskulární miRNA

MiRNA mohou být řazeny do několika skupin dle svého uplatnění v konkrétních tkáních. Jednou z nich jsou kardiovaskulární miRNA, jež mají vztah k patogenezi kardiovaskulárních chorob a zároveň uplatňují svůj vliv v těhotenství ovlivňováním míry placentární insuficience (Liang *et al.*, 2007). Do mé práce bylo vybráno 32 kardiovaskulárních miRNA, které jsou v přehledu v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 Přehled zkoumaných kardiovaskulárních miRNA, jejich lokace a genová sekvence

Název	Umístění	miRNA sekvence
hsa-miR-1	Chr20: 61151513-61151583 [+]	5'-UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3'
hsa-miR-16	Chr13: 50623109-50623197 [-]	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'
hsa-miR-17	Chr13: 92002859-92002942 [+]	5'-CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG-3'
hsa-miR-20a	Chr13: 92003319-92003389 [+]	5'-UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG-3'
hsa-miR-20b	ChrX: 133303839-133303907 [-]	5'-CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG-3'
hsa-miR-21	Chr17: 57918627-57918698 [+]	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
hsa-miR-23a	Chr19: 13947401-13947473 [-]	5'-AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC-3'
hsa-miR-24	Chr19: 13947101-13947173 [-]	5'-UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG-3'
hsa-miR-26a	Chr3: 38010895-38010971 [+]	5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'
hsa-miR-29a	Chr7: 130561506-130561569 [-]	5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'
hsa-miR-33a	Chr22: 42296948-42297016 [+]	5'-GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA-3'
hsa-miR-92a	Chr13: 92003568-92003645 [+]	5'-UAAUGCACUUGUCCCCGGCCUGU-3'
hsa-miR-100	Chr11: 122022937-122023016 [-]	5'-AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG-3'
hsa-miR-103	Chr20: 3898141-3898218 [+]	5'-AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA-3'
hsa-miR-122	Chr18: 56118306-56118390 [+]	5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3'
hsa-miR-125b	Chr21: 17962557-17962645 [+]	5'-UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA-3'
hsa-miR-126	Chr9: 139565054-139565138 [+]	5'-UCGUACCGUGAGUAAUAUUGCG-3'
hsa-miR-130b	Chr22: 22007593-22007674 [+]	5'-CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU-3'
hsa-miR-133a	Chr20: 61162119-61162220 [+]	5'-UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG-3'
hsa-miR-143	Chr5: 148808481-148808586 [+]	5'-UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC-3'
hsa-miR-145	Chr5: 148810209-148810296 [+]	5'-GUCCAGUUUUCACAGGAAUCCCU-3'
hsa-miR-146a	Chr5: 159912359-159912457 [+]	5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGGU-3'
hsa-miR-155	Chr21: 26946292-26946356 [+]	5'-UUAUUGCUAAUCGUGAUAGGGGU-3'
hsa-miR-181a	Chr9: 127454721-127454830 [+]	5'-AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU-3'
hsa-miR-195	Chr17: 6920934-6921020 [-]	5'-UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC-3'
hsa-miR-199a	Chr19: 10928102-10928172 [-]	5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC-3'
hsa-miR-208	Chr14: 23857805-23857875 [-]	5'-AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU-3'
hsa-miR-210	Chr11: 568089-568198 [-]	5'-CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3'
hsa-miR-221	ChrX: 45605585-45605694 [-]	5'-AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC-3'
hsa-miR-342-3p	Chr14: 100575992-100576090 [+]	5'-UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU-3'
hsa-miR-499	Chr20: 33578179-33578300 [+]	5'-UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU-3'
hsa-miR-574-3p	Chr4: 38869653-38869748 [+]	5'-CACGCUCAUGCACACACCCACA-3'

Na poli výzkumu miRNA zbývá ještě mnoho práce. Prozatím nebyly odhaleny všechny funkce miRNA a oblasti, ve kterých hrají roli. Jedním z problémů je neznalost životnosti jednotlivých miRNA, poločas jejich rozpadu a všechny důsledky jejich působení. Způsob degradace miRNA však ještě nebyl přímo předmětem studií. Maturované miRNA jsou však považovány za celkově stabilní (Winter *et al.*, 2009).

3. Těhotenské komplikace

Období těhotenství je všeobecně považováno za náročný úsek života ženy. V tomto období může dojít k řadě biologických změn, které mohou vyústit v mnoho klinicky závažných onemocnění v pozdějším životě ženy. Průběh těhotenství je řízen mnoha faktory. Jednu z hlavních rolí hrají hormony. V těhotenství působí na oba organismy – na matku i plod, hormony produkované matkou, placentou a později i hormony produkované samotným plodem. Naprosto nezbytným, ačkoliv dočasným, orgánem pro udržení a úspěšné dokončení těhotenství je placenta, zajišťující výměnu živin, kyslíku, hormonů a dalších látek mezi matkou a plodem. Jedná se o nezbytný metabolický a endokrinní orgán, na jehož správné funkci závisí těhotenství samotné (Maccani *et al.*, 2010).

Placenta při normálním průběhu těhotenství disponuje velkým množstvím specifických buněk, které se shlukují do funkčních skupin a řídí správný vývoj, růst a genezi konkrétních orgánů plodu (Fisher S., 2004). Pokud placenta ve svých funkcích selhává, nebo jsou její funkce výrazně omezeny, dochází k rozvoji těhotenských komplikací.

3.1. Preeklampsie

Jednou z těhotenských komplikací je preeklampsie, která postihuje 5-8 % gravidit a může skončit smrtí matky nebo dítěte, zejména v rozvojových zemích (WHO, 1988; Bamfo and Odibo, 2011; Zhao *et al.*, 2013). V klinicky závažných případech ohrožujících matku se přistupuje k okamžitému porodu plodu a placenty, neboť přítomnost placenty v těle matky je příčinou tohoto onemocnění.

Jedná se o systém komplikací zahrnující hypertenzi, proteinurii a jiné systémové poruchy (Hu *et al.*, 2009). K její manifestaci dochází po dvacátém týdnu těhotenství (ACOG practice bulletin, 2002). Okolo dvaceti procent případů preeklampsie může vyústit až v syndrom HELLP, což vede k hemolýze, zvýšené funkci jater a snížení počtu krevních

destiček. V některých případech může dojít k zastavení vývoje a růstu plodu. Vážnost onemocnění spočívá v jeho velmi náhlé manifestaci bez předchozích příznaků kdykoliv od poloviny druhého trimestru (DiFederico *et al.*, 1999; Genbacev *et al.*, 1999).

Apoptotická tělíska placentárního trofoblastu jsou placentou uvolňována během těhotenství do krevního oběhu matky, což je zcela fyziologický fenomén, ovšem při preeklampsii dochází k nadměrné apoptóze placentárního trofoblastu v důsledku hypoxie placenty. Zároveň nedostatečná remodelace mateřských spirálních arterií vyživujících placentu, přispívá k navození hypoxie v krevním oběhu plodu (DiFederico *et al.*, 1999). S tím přímo souvisí přítomnost abnormálních hladin extracelulární fetální DNA, placentárních transkriptů (mRNA) a některých placentárních miRNA v periferní krvi matky, které umožňují placentární insuficienci detekovat.

Výše zmíněné faktory naznačují, že preeklampsie je spojena s abnormální imunitní odpovědí mateřského organismu na těhotenství. Zda je PE dědičná nebylo prozatím podloženo žádnými studiemi, většina případů se objevuje bez předchozího výskytu v rodině, tedy *de novo*.

3.1.1. Klasifikace a diagnostika preeklampsie

Preeklampsii lze diagnostikovat jako mírnou (mild) formu a/nebo závažnou (severe) formu (Hu *et al.*, 2009). Mírná forma se projevuje následujícími příznaky (ACOG practice bulletin, 2002; Zhao *et al.*, 2010):

- systolický krevní tlak ≥ 140 mmHg při dvojím měření v intervalu šesti hodin,
- diastolický krevní tlak ≥ 90 mmHg při dvojím měření v intervalu šesti hodin,
- proteinurie ≥ 300 mg proteinů ve 24 hodinovém sběru moči.

O závažnou (severe) PE se jedná v případě, že je přítomen jeden nebo více z těchto faktorů (ACOG practice bulletin, 2002):

- systolický krevní tlak ≥ 160 mmHg nebo diastolický krevní tlak ≥ 110 mmHg při dvojitým měření v intervalu šesti hodin v klidovém režimu,
- hladiny proteinurie ≥ 5 g ve 24 hodinovém sběru moči,
- množství moči během 24 hodin ≤ 500 ml,
- plus k tomu alespoň jeden z těchto dalších symptomů: plicní edém, poruchy centrálního nervového systému (poruchy vidění, bolesti hlavy), porucha funkce jater (nevolnost, zvracení), trombocytopenie (snížený počet krevních destiček), intrauterinní růstová retardace, příznaky respiračních potíží, bolest v oblasti srdce.

V současné době neexistují žádné ověřené markery, které by umožňovaly diagnostikovat preeklampsii před tím, než se projeví její klinické symptomy. Jediným způsobem je měření dopplerovských parametrů, které monitorují průtok cévami plodu, pupečníku a dělohy. U některých pacientek, u nichž byla později diagnostikována PE, dochází ke zhoršení průtoku v cévách již ve druhém trimestru.

Predispozici k PE v těhotenství mají ženy, které trpí záněty žil, diabetem melitus, obezitou, oxidačním stresem a nízkým přísunem vitamínu C a E (Fischer S., 2004). Matky, které měly v průběhu alespoň jednoho těhotenství PE, mají větší riziko budoucího výskytu nejen PE, ale též onemocnění kardiovaskulárního systému, především infarktu myokardu a mrtvice. Děti, které se narodí z těhotenství s PE, mají také do budoucna obecně větší riziko kardiovaskulárních onemocnění, například mrtvice. Navíc také epilepsie, metabolických a hematologických poruch, a to jak v pozdějším dětství, tak v dospělosti (Devor *et al.*, 2013). Ženy, které měly v průběhu těhotenství PE, mají v souhrnu zvýšené riziko výskytu kardiovaskulárních chorob, na rozdíl od žen, které prodělaly fyziologickou graviditu (McDonald *et al.*, 2013).

Placenta tedy hraje klíčovou roli v rozvoji PE, dle Pineles a kol. je pro rozvoj PE charakteristická up-regulace specifických miRNA v placentě (Pineles *et al.*, 2007).

Nedávné klinické studie poukázaly, že je žádoucí zjistit, kdy k rozvoji PE dochází. Časný nástup PE je jednoznačně výsledkem nesprávného fungování placenty (Valensise *et*

al. 2008). Studie založené na analýzách pomocí metody PCR v reálném čase potvrdily, že PE je spojena se změnami v expresi miRNA. Byla prokázána up-regulace miR-16, miR-17, miR-195, miR-210 a down-regulace miR-1, miR-210 v placentární tkáni (Enquobahrie *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2009; Mayor – Lynn *et al.*, 2011; Pineles *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012), dále up-regulace miR-210 a down-regulace miR-155 u pacientek s PE v séru (Gunel *et al.*, 2011).

Ženy, které prodělaly těhotenství s PE, mají větší riziko pozdějšího vývoje kardiovaskulárních onemocnění, konkrétně čtyřnásobně vyšší riziko hypertenze a dvojnásobně ICHS, mozkové mrtvice a žilní trombózy (Craici *et al.*, 2008).

3.2. Gestační hypertenze

Gestační hypertenze je jednou z těhotenských komplikací, která postihuje přibližně 5-7 % ze všech těhotenství napříč celým světem. Jedná se o stav, kdy krevní tlak je větší, než 140/90 mmHg a může akcelarovat v preeklampsii nebo jinou plod i matku ohrožující komplikaci (Lykke *et al.*, 2009).

Hypertenze v těhotenství vede k dlouhodobým metabolickým a cévním abnormalitám v těle matky, které mají vliv na pozdější vývoj kardiovaskulárních chorob (Garovic and Hayman, 2007; Libby *et al.*, 2007; Männistö *et al.*, 2013). Diagnóza gestační hypertenze (GH) je tedy jedním z uznaných faktorů, které mají vliv na pozdější vývoj kardiovaskulárních onemocnění (hypertenze, ischemická choroba srdeční, ateroskleróza, žilní trombózy, mozková mrtvice, srdeční selhání, nebo metabolický syndrom) u ženy, která GH v průběhu těhotenství trpěla (Bellamy *et al.*, 2007; Craici *et al.*, 2008; Haukkamaa *et al.*, 2009; Lykke *et al.*, 2009; Berks *et al.*, 2013; McDonald 2013).

3.3. Fetální růstové poruchy

Fetální růstová retardace je skupinou onemocnění postihujících plod. Charakteristickým rysem je pro FGR opožděný růst plodu, což může být zapříčiněno nedostatečnou funkcí placenty, ale i jinými faktory ze strany matky i plodu, dokonce nelze vyloučit ani vnější a enviromentální faktory. FGR rozdělujeme s ohledem na malou velikost nebo nízkou hmotnost plodu na tři rozdílné diagnózy: těhotenství s IUGR - intrauterinní růstovou retardací, těhotenství s SGA – malými plody vzhledem ke gestačnímu stáří a těhotenství s nízkou porodní hmotností – LBW (low birth weight). Ve všech případech se jedná o situaci, kdy plod zcela nevyužije svůj veškerý růstový potenciál (ACOG, 2013). Hlavními příčinami vzniku FGR jsou nedostatečný přísun živin a kyslíku k plodu. V případě komplikací na straně matky mohou být příčinou (Baschat, 2006):

- genetické faktory,
- nutriční faktory,
- celkový zdravotní stav matky (preeklampsie, diabetes mellitus 1. typu, poruchy pojivové tkáně, onemocnění plic a ledvin),
- užívání návykových látek během těhotenství,
- předchozí výskyt těhotenských komplikací.

Komplikace na straně plodu zahrnují (Baschat, 2006):

- aneuploidie,
- infekce,
- genetické syndromy,
- abnormality umístění pupečníku,
- vícečetné těhotenství

Komplexně nejčastějším původcem těchto poruch bývá placentární insuficience. U FGR stejně jako u PE je zaznamenán zvýšený počet apoptotických tělísek vypouštěných placentou do krevního oběhu matky v porovnání s FG (Crocker *et al.*, 2004). Tři čtvrtiny případů FGR bývají spojovány s nedostatečnou funkcí placenty a špatnou cirkulací mezi plodem a organismem matky (Higashijima *et al.*, 2013). Mezi příčiny FGR na straně placenty řadíme (Baschat, 2006):

- chronický zánět,
- abnormální invaze trofoblastu,
- placentární infarkt
- nesprávně vyvinuté cévní řečiště v pupečníku i placentě.

FGR lze diagnostikovat ještě před porodem běžnou lékařskou prohlídkou pomocí ultrazvuku. Nízkou porodní hmotnost definuje WHO jako $\leq 2500\text{g}$. Novorozenec s hmotností $\leq 2500\text{g}$ má až dvacetkrát větší riziko úmrtí než novorozenec s vyšší porodní hmotností. SGA plody a novorozence charakterizujeme porodní hmotností pod desátým percentilem populační normy pro dané gestační stáří a novorozenec či plod s IUGR je charakteristický hmotnostními parametry pod třetím percentilem populační normy. Rizikovým faktorem pro tyto diagnózy je hypertenze a onemocnění ledvin u matky (WHO, 2010). Klíčovou roli v diagnostice FGR hraje správné určení gestačního stáří, k čemuž se užívá ultrasonografické vyšetření.

IUGR patří mezi závažné komplikace těhotenství. Vzhledem k placentární insuficienci je plod nedostatečně vyživován, což se manifestuje jeho nízkou porodní hmotností, jež může vést k závažným růstovým a vývojovým vadám v důsledku nedostatku konkrétních látek. Zásadním problémem je nedostatečný přísun kyslíku k plodu, jehož častým výsledkem je úmrtí plodu, ať již před porodem, nebo bezprostředně po něm, obvykle v důsledku selhání špatně vyvinutých životně důležitých orgánů. K diagnostikování IUGR se přistupuje v případě, že váha plodu je odhadována vzhledem k průměru pod třetím percentilem vzhledem ke svému gestačnímu stáří (Hadlock Astraia

Software GmbH, 1994). Tyto faktory je nutné adjustovat k populačním normativům České republiky.

V lidské placentě byly identifikovány miRNA (miR-146a, miR-16, miR-21, – down-regulace u FGR), které jsou asociovány s výskytem nižší porodní hmotnosti, a které by tudíž mohly mít souvislost s výskytem placentární dysfunkce typu IUGR (Maccani *et al.*, 2011).

Riziko vzniku chronických onemocnění v pozdějším životě ženy se zvyšuje v případě, že prodělala v průběhu těhotenství některou z výše zmíněných komplikací, popřípadě jejich kombinaci. Zejména u žen s preeklampií v těhotenství, opakovanými spontánními potraty, předčasnými porody a/ nebo porody plodů s IUGR byl zaznamenán pozdější výskyt kardiovaskulárních onemocnění, přičemž nejčastější byl výskyt onemocnění věnčitých tepen a kardiovaskulárních nebo tromboembolických příhod (Bonamy *et al.*, 2011).

Nízká porodní hmotnost dítěte zvyšuje u matky riziko onemocnění ischemickou chorobou srdeční (Lykke *et al.*, 2012). Ženy, které prodělaly preeklampsii mají 90% riziko vzniku ischemických chorob srdečních, hlavním důvodem jsou ve většině případů trvalé změny krevního tlaku a metabolismu tuků, které jsou způsobené proděláním preeklamptického těhotenství a které podporují rozvoj aterosklerotických změn.

4. Kardiovaskulární onemocnění

Těhotenství zahrnuje mnoho změn, mezi které patří i adaptace kardiovaskulárního systému (zvětšení krevního objemu, snížení pružnosti cévního systému, a jiné metabolické změny). Těhotenské komplikace násobí riziko pozdějšího výskytu chronických onemocnění, včetně kardiovaskulárních (Männistö *et al.*, 2013). Ženy, které měly těhotenské komplikace, mají 2,5krát větší riziko výskytu CVDs, než ženy s fyziologickým průběhem těhotenství. Pokud žena prodělala více než jedno komplikované těhotenství, je toto riziko 4,2krát vyšší, než u žen s FG (Freibert *et al.*, 2011). Posledních deset let je kardiovaskulární onemocnění příčinou úmrtí čím dál častěji. V 50 – 60% je příčinou úmrtí žen právě kardiovaskulární onemocnění (Berks *et al.*, 2013).

Profil genové exprese miRNA a jeho vliv na kardiovaskulární systém byl již studován u vybraných onemocnění, která člověka postihují, jakými je ateroskleróza, srdeční hypertrofie, hypertenze a další (Staszek *et al.*, 2011). Nedávné studie ukázaly, že některé miRNA hrají zásadní roli v indukci a rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (Kharazmi *et al.*, 2011). Jsou také považovány za důležité intracelulární mediátory pro zachování správné srdeční funkce a mohly by být využívány v léčbě těchto onemocnění (Empel *et al.*, 2012). MiRNA se uplatňují ve vzniku srdečních hypertrofií, u fibróz a srdečních selhání.

Mezi onemocnění kardiovaskulárního systému (CVDs) řadíme mozkové mrtvice, infarkt myokardu, srdeční selhání, ischemické choroby, idiopatické hypertenze, onemocnění žil, aj.

4.1. Mozková mrtvice

Mozková mrtvice je jednou z nejčastějších cerebrovaskulárních chorob, která se vyznačuje ucpáním tepny vedoucí k mozku a následným narušením mozkových cév. Důsledkem je riziko nenávratného poškození mozku. Deset procent pacientů zemře okamžitě, dalších 38 % na její následky během třiceti dnů. Jak bylo již řečeno, velmi vysoké procento pacientů má ireverzibilní poškození mozku.

K rizikovým skupinám patří muži starší padesáti let a nově ženy okolo třiceti let dlouhodobě užívající hormonální antikoncepci. Riziko mozkové mrtvice se zvyšuje, pokud žena měla těhotenské komplikace, velký vliv má PE, která zvyšuje riziko téměř dvojnásobně (Bellamy *et al.*, 2007; Berks *et al.*, 2013). GH v těhotenství má za následek přibližně 1,5krát vyšší riziko mozkové mrtvice (Männistö *et al.*, 2013).

4.2. Infarkt myokardu

Infarkt je statisticky nejčastější příčinou úmrtí obyvatel ve vyspělých zemích, což je důsledkem požívání stravy bohaté na tuky a nedostatku pohybu. Predispozice k tomuto problému jsou částečně genetické a částečně jsou ovlivněny enviromentálními faktory včetně životního stylu. Vliv na rozvoj infarktu myokardu mají také komplikace v těhotenství. Ženy, které jednou, či vícekrát potratily, mají až devětkrát vyšší riziko, že budou postiženy infarktem myokardu (Kharazmi *et al.*, 2011).

Nejčastější příčinou infarktu bývá ateroskleróza, což je utváření ateromů nahromaděním tukových buněk v cévách, které se později mohou uvolnit a cévním řečištěm doputovat do věnčitých tepen srdce. Mezi pacienty s aterosklerózou bývá vysoké procento žen, které prodělaly během těhotenství jakoukoliv formu PE (Haukkamaa *et al.*, 2009). S rizikem infarktu myokardu se pojí výskyt GH v předchozím těhotenství. Tato těhotenská komplikace zvyšuje riziko infarktu 1,75krát a třikrát zvyšuje riziko úmrtí v důsledku prodělaného infarktu (Männistö *et al.*, 2013). Prodělání infarktu myokardu či

ischemické choroby srdeční v mnoha případech vyústí v srdeční selhání, k němuž může dojít i bez předchozích potíží. Po těhotenství s GH je riziko srdečního selhání téměř dvojnásobné (Männistö *et al.*, 2013).

K typickým změnám, které po prodělání infarktu v organismu nastávají, patří změna v tvaru levé komory srdeční, přičemž tato modifikace bývá častou příčinou úmrtí. Vzhledem k vážným důsledkům kardiovaskulárních onemocnění by bylo velmi přínosné stanovit markery, které by pomohly tyto komplikace odhalit dříve, než se projeví klinicky. Významným přínosem jsou rozdíly v hladinách vybraných kardiovaskulárních miRNA (Devaux *et al.*, 2013). V souvislosti s aterosklerózou, infarktem myokardu a srdečním selháním byl popsán unikátní profil genové exprese několika kardiovaskulárních miRNA (miR-1 – down-regulace u hypertorfie srdce, miR-16 – anti-angiogenní funkce, miR-17 – down-regulace u onemocnění žil a srdečních vad, miR-20b – down-regulace u hypoxie, miR-21 – up-regulace při akutním koronárním selhání a v aterosklerotických plátech, miR-23a – up-regulace u hypertofie srdce, miR-24 – up-regulace narušuje angiogenezi, zlepšuje hojení transplantovaných srdečních progenitorových buněk, miR-26a – regulace neovaskularizace, miR-29a - up-regulace u hypertofie srdce, miR-33a – posttranskripční regulátor genů metabolismu lipidů, miR-92a – down-regulace u srdečního selhání, miR-100 – anti-angiogenní funkce, miR-122 -posttranskripční regulátor genů metabolismu lipidů, miR-125b – regulace kalcifikace vaskulárních buněk hladké svaloviny, miR-126 – regulace angiogeneze a vaskulární zánětlivé reakce, miR-103 – regulace genů pro ventrikulární hypertofii, miR-130a – up-regulace u onemocnění žil a srdečních vad , miR-143 – vliv na proliferaci buněk hladké svaloviny, miR-155 – down-regulace u pacientů s rupturou srdeční komory, miR-181a - down-regulace u onemocnění žil a srdečních vad, miR-195 – pro-apoptotická role v buňkách srdeční svaloviny, miR-199a – podpora apoptózy myocytů, miR-208a – up-regulace u kardiovaskulárních chorob, miR-210 – up-regulace v aterosklerotických plátech, miR-499 – up-regulace u kardiovaskulárních chorob, plazmatický marker postižení myokardu), a to celou řadou autorů (D'Alessandra *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2013; Gidlöf *et al.*, 2011; Ikeda *et al.*, 2007; Raitoharju *et al.*, 2011; Rayner *et al.*, 2012; Sucharov *et al.*, 2008; Urbich *et al.*, 2008; Voellenkle *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2013).

4.3. Ischemická choroba srdeční

Ischemická choroba srdeční se vyznačuje náhlou apoptózou mnoha srdečních buněk provázenou zdlouhavou a nedokonalou rekonvalescencí. Po zničení tak vysokého počtu buněk následuje změna proteinové distribuce (k té může dojít i během akutního infarktu myokardu). Díky tomu lze zjistit pomocí hladin konkrétních proteinů v periferní krvi pacienta, zda organismus infarkt doopravdy prodělal. Riziko výskytu těchto chorob je zvýšené, pokud žena porodila jedno či více dětí s IUGR (Lykke *et al.*, 2012). Ukázalo se, že proděláním jednoho, či více těhotenství, která byla provázena některou z forem PE nebo IUGR je značným rizikem pro pozdější výskyt ischemické choroby srdeční, pro PE je 16,92krát větší riziko výskytu ICHS a pro IUGR 6,52krát větší (Borna *et al.*, 2012).

Jedním z rizikových faktorů pro budoucí rozvinutí ICHS je obezita. Obezita působí jako systémový chronický zánět a mnohonásobně zvyšuje riziko metabolického syndromu, také může vyústit až v ICHS. Profil genové exprese některých z testovaných kardiovaskulárních miRNA (miR-181a – exprese koreluje s imunitní a zánětlivou odpovědí organismu, miR-342-3p – up-regulace u obezity) prokazuje vliv na probíhající zánětlivé procesy (Hulsmans *et al.*, 2012).

Dysregulace genové exprese těchto kardiovaskulárních miRNAse uplatňují u ICHS: protektivní roli u ICHS hraje miR-1, miR-21, miR-92a, miR-126. MiR-17, – down-regulace u vývojových vad kardiovaskulárního systému, miR-143 a miR-145 – regulace geneze srdeční svaloviny, miR-155 – cílový receptor proteinu 1, miR-181a – regulace proliferace, miR-195 – podpora apoptózy kardiomyocytů, miR-133a a miR-208a – up-regulace u kardiovaskulárních chorob, miR-221 – up-regulace zlepšuje přihojení transplantovaných srdečních buněk (Fichlscherer *et al.*, 2010; Poliseno *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012).

4.4. Idiopatická hypertenze

Idiopatická, jinak také základní, esenciální nebo primární hypertenze je hlavním rizikovým faktorem pro infarkt myokardu, srdeční selhání, mozkovou mrtvici a selhání ledvin. Jedná se o vysoký krevní tlak, který je silnou zátěží především pro srdce. Riziko výskytu hypertenze je více než pětikrát vyšší v případech, kdy žena měla v průběhu těhotenství gestační hypertenzi, přibližně 3,5krát vyšší po manifestaci mírné formy PE a až šestkrát vyšší po manifestaci závažné PE (Lykke *et al.*, 2009).

4.5. Onemocnění žil

Onemocnění žil patří mezi významné kardiovaskulární choroby ohrožující mnoho lidí napříč všemi věkovými kategoriemi. Poslední výzkumy ukazují, že by mohly miRNA hrát klíčovou roli v jejich diagnostice. Stejně jako u výše zmíněných onemocnění mají těhotenské komplikace značný vliv na jejich rozvoj. Riziko onemocnění žil po komplikacích v těhotenství je přibližně 1,5 – 2krát vyšší (Bellamy *et al.*, 2007; Lykke *et al.*, 2009). Byla nalezena souvislost mezi zvýšenou expresí kardiovaskulárních miRNA a onemocněním cév: miR-29a a miR-126 – regulace angiogeneze, miR-146a – up-regulace v angiogenních buňkách u pacientů s chronickým onemocněním srdce, miR-155 – down-regulace u patogeneze žilních onemocnění, miR-210 – pozitivní vliv na angiogenezi, miR-221 – up-regulace u žilních onemocnění (Harris *et al.*, 2008; O'Connell *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

4.6. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je jedním z nejčastěji se vyskytujících chronických onemocnění, postihujících přibližně 6,4 % světové populace. Jedná se o onemocnění metabolické, které má negativní vliv na kardiovaskulární systém. Některé studie prokázaly, že níže zmíněné kardiovaskulární miRNA mají souvislost s diabetem. DM lze klasifikovat do tří kategorií:

- Diabetes mellitus prvního typu (DM1) je autoimunitní onemocnění vyznačující se zánětlivou reakcí ničící buňky slinivky břišní, což vede ke změně glukózového metabolismu a nedostatku inzulínu (Collares *et al.*, 2013).
- Diabetes mellitus druhého typu (DM2) je v posledních letech celosvětově rozšířen a počty nemocných stále stoupají. Je dáván do souvislosti s obezitou. Není založený na nedostatku inzulínu, ale na rezistenci organismu k inzulínu (Zhou *et al.*, 2012). Diabetes mellitus druhého typu je nejrizikovějším faktorem pro vznik kardiovaskulárních onemocnění. Je charakterizován zvýšenou hladinou glukózy v krvi a inzulínovou rezistencí. Dále způsobuje poruchy a cévní komplikace (van Empel *et al.*, 2012). K jeho rozvoji napomáhají zvýšené hladiny cholesterolu v krvi, zvýšený krevní tlak, narušení glukózové tolerance, onemocnění rodičů diabetem druhého typu a jiné. Tato nemoc se vyskytuje napříč věkovými kategoriemi, u obou pohlaví a postihuje všechna etnika, což ztěžuje možnost její predikce a prevence.
- Gestační diabetes mellitus (GDM) je onemocněním, při kterém dochází ke glukózové intoleranci spojené s nástupem změn, souvisejících s těhotenstvím. Po porodu se obvykle samo stabilizuje.

Několik studií ukázalo, že tato onemocnění souvisí s typickými hladinami kardiovaskulárních miRNA: miR-21, miR-126 a miR-133a – řídí syntézu kardioprotektivních proteinů, miR-103 – regulace buněčného cyklu, miR-181a – regulace imunitní a zánětlivé odpovědi (Collares *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2011; Zampetaki *et al.*, 2010).

Některé studie ukazují, že riziko výskytu DM se zvyšuje, pokud dojde během těhotenství k růstové retardaci plodu (Lykke *et al.*, 2012). Rizika jsou dána závažností a typem těhotenských komplikací. Ohrožení DM2 se zvyšuje třikrát, pokud předchozí těhotenství bylo provázeno GH a téměř čtyřikrát po prodělané závažné PE. S počtem komplikovaných těhotenství se ještě riziko pozdějšího výskytu DM2 zdvojnásobuje (Lykke *et al.*, 2009).

Přes všechna tato fakta je nutné přihlédnout i k životnímu stylu pacientek. Byl proveden výzkum prokazující možnost výše zmíněná rizika navzdory jejich závažnosti snížit. Především prostřednictvím změny životního stylu (eliminace kouření cigaret, aktivní životní styl) a dietetických návyků (prevence obezity). Jsou zdokumentovány případy, kdy pacientky, jež měly v těhotenství PE, minimalizovaly riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob právě úpravou životního stylu a stravovacích návyků (Berks *et al.*, 2013).

5. Cíle práce

Preeklampsie a růstová retardace plodu patří mezi nejzávažnější komplikace postihující 4-10 % těhotenství, které mají přímý vliv na perinatální morbiditu a mortalitu. Cílem mé práce bylo zjistit, jestli se vyskytuje dysregulace kardiovaskulárních miRNA již v průběhu gravidity v souvislosti s výskytem těhotenských komplikací a zda je tato dysregulace základem pro pozdější výskyt kardiovaskulárních onemocnění.

Předpokladem je, že genová exprese jednotlivých kardiovaskulárních miRNA se může významně lišit v průběhu těhotenství mezi fyziologickou graviditou a jednotlivými těhotenskými komplikacemi.

Pomocí kvantitativní PCR v reálném čase byla stanovena míra genové exprese kardiovaskulárních miRNA, které byly do studie vybrány na základě výsledků z předchozích studií. Tyto hladiny byly zjišťovány u vzorků žen v průběhu gravidity, a to jak fyziologických (FG), tak patologických (PE, GH, IUGR). Výsledky této studie mohou významně přispět nejen k detekci závažných těhotenských komplikací, ale i k pozdějšímu výskytu kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění.

6. Materiál

Pro výzkum byly použity dva typy biologického materiálu - periferní žilní krev těhotných žen a placentární tkáň z centrálního kotyledonu. Vzorky krve pacientek s fyziologickým průběhem těhotenství poskytla laboratoři 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy Fakultní nemocnice v Motole. Vzorky s patologickým průběhem těhotenství byly získány z Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze.

Do projektu nebyly zařazeny vícečetné gravidity a těhotenství po IVF (in vitro fertilizace) a IUI (in utero inseminace). Všechny vzorky zahrnuté do studie byly poskytnuty s informovaným souhlasem s účastí na výzkumném projektu a se souhlasem etické komise.

Před započítáním studie byl proveden výběr optimálních endogenních kontrol pro normalizaci dat genové exprese. Bylo testováno celkem 19 genů (RNU6B, RNU19, RNU24, RNU38B, RNU43, RNU44, RNU48, RNU49, RNU58A, RNU58B, RNU66, U6snRNA, U18, U47, U54, U75, HY3, RPL21, Z30), a to jak na souboru vzorků z placentární tkáně (80), tak později na souboru vzorků periferní krve matky (76).

Celkový soubor vzorků z placentární tkáně byl tvořen původně 80 vzorky: 20 fyziologických gravidit (FG), 20 pacientek s gestační hypertenzí (GH), 20 pacientek s intrauterinní růstovou retardací (IUGR) a 20 pacientek s preeklampsií (PE). Později byl soubor navýšen o vzorky s diagnózou preeklampsie z původních 20 na 67. Soubor vzorků pacientek s PE obsahoval 38 závažných PE, z toho 18 žen s porodem před a 20 žen s porodem po 34. týdnu gravidity; a 29 vzorků s mírnou formou PE, z nichž 3 ženy rodily před 34. týdnem a 26 žen po 34. týdnu gravidity. Z celkového počtu 67 vzorků s PE mělo 20 předchozí výskyt hypertenze (tzn. superponovanou formu PE) a 47 žen mělo PE bez předchozí elevace hodnot krevního tlaku (nesuperponované).

Druhý soubor zahrnoval vzorky získané z periferní žilní krve matek a obsahoval celkem 80 vzorků s rozložením 20 FG, 20 IUGR, 20 GH a 20 PE. Tyto vzorky tvořily

komplementární dvojice ke vzorkům z placentární tkáně, které byly zpracovány v první fázi projektu.

Do studie byly zařazeny tyto kardiovaskulární miRNA: miR-1, miR-16, miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-33a, miR-92a, miR-100, miR-103, miR-122, miR-125b, miR-126, miR-130b, miR-133a, miR-143, miR-145, miR-146a, miR-155, miR-181a, miR-195, miR-199a, miR-208, miR-210, miR-221, miR-342-3p, miR-499 a miR-574-3p. (souhrn zmíněných kardiovaskulárních miRNA, jejich sekvence viz kapitola č. 2.)

7. Metody

Předmětem výzkumu byla izolace RNA obohacená o krátké RNA molekuly, měření koncentrace izolované RNA, reverzní transkripce (přepsání RNA na cDNA) a kvantifikace genové exprese miRNA pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Poslední částí výzkumu bylo statistické zpracování získaných dat a jejich následná interpretace.

7.1. Definování zahrnutých diagnóz

Konkrétní těhotenské komplikace byly diagnostikovány s ohledem na mezinárodně platná kritéria (dříve zmíněné parametry).

Normální těhotenství bylo definováno jako fyziologická gravidita bez komplikací s porodem v termínu, tj. po dokončeném 37. týdnu gravidity. Dítě bylo zdravé, disponovalo všemi životně důležitými funkcemi a splňovalo hmotnostní parametry v rozmezí 2500 – 4000 g.

Gestační stáří plodu pro diagnostiku fáze vývoje bylo určováno na základě ultrasonografických parametrů.

7.2. Zpracování biologického materiálu

Pro účely výzkumu byla RNA získána z periferní krve matek a placentární tkáně. Veškeré úkony podléhaly přesným protokolům a manipulace s biologickým materiálem probíhala v souladu s vnitřními předpisy laboratoře. Veškerá manipulace se vzorky a chemikáliemi probíhala výhradně v prostorách k tomu určených – laboratoře, izolační nebo PCR boxy. Ke zpracování všech vzorků byl pacientkami poskytnut informovaný souhlas, dále byl poskytnut souhlas etické komise.

7.3. Izolace RNA obohaceného krátké RNA molekuly z placentární tkáně

K extrakci RNA z placentární tkáně byl použit mirVana microRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, USA). K analýze byl použit malý kousek vyčištěné tkáně uchované v RNA lateru (Ambion, Austin, USA), optimálně v rozmezí 30 – 70 mg. Pomocí skalpelu byla tkáň rozdělena na malé kousky a vložena do zkumavky o objemu 5 ml. Na ledu byl přidán ke vzorku desetinásobek hmotnosti pufru (Lysis/Binding Buffer) a pomocí homogenizátoru (Tissue Raptoru, Qiagen) byla směs homogenizována. Poté byla přidána desetina objemu miRNA Homogenate Additive, použit vortex a 10 minut byla směs inkubována na ledu. Po inkubaci byl přidán 1 μ l 100 nmol syntetické cel-miR-39 (c. elegans) a poté Phenol:Chloroform (Ambion, Austin, USA) ve shodném množství původního lyzátu. Následovalo promíchání směsi pomocí vortexu a rozdělení směsi do zkumavek o objemu 2 ml, které byly poté stočeny při $10\,000 \times g$ po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Stočením došlo k oddělení vodné fáze, která byla odebrána a poté byla přidána 1/3 celkového objemu 100 % ethanolu. Vzniklá směs byla aplikována na kolonku mirVana izolačního kitu a stáčena 15 s při $10\,000 \times g$. Vzhledem k nižší koncentraci ethanolu se ve filtru kolonky zachytily dlouhé molekuly RNA. Filtrát byl přenesen do nové zkumavky a byly přidány 2/3 objemu 100 % ethanolu. Opět jsem aplikovala směs na kolonku a 15 s stáčela při $10\,000 \times g$. Zmíněná koncentrace ethanolu je dostatečně vysoká, aby došlo k zachycení krátkých RNA molekul na filtru kolonky. Filtr se zachycenou RNA byl čištěn prostřednictvím promývacích roztoků. Po odstranění reziduální tekutiny bylo aplikováno na kolonku 100 μ l elučního roztoku o teplotě 95 °C a vzniklá směs byla stáčena 30 – 40 s na maximum.

Elučním roztokem byly z filtru vyplaveny krátké RNA molekuly. Případná kontaminace DNA byla odstraněna Dnasou I (Fermentas International) inkubací po dobu 30 minut při 37 °C. Posledním krokem k izolaci RNA z placentární tkáně bylo přidání 5 μ l EDTA a následná inkubace 10 minut při 65 °C.

7.4. Izolace RNA obohacené o krátké RNA molekuly z plné krve matky

Pro přípravu na izolaci z krve byla odebrána žilní krev pacientky do zkumavky s protisrážlivým činidlem (EDTA). RNA byla izolována z 200 µl periferní krve QIAamp RNA Blood Mini Kitem (Qiagen, Hilde, Germany). Dané množství krve bylo smícháno s 1000 µl pufru EL a inkubováno 10 – 20 minut na ledu, následně vloženo do centrifugy a stáčeno 10 minut při 400 x g při 4°C. Po odstranění supernatantu bylo přidáno k peletě buněk 400 µl pufru EL. Po další centrifugaci byl odstraněn odloučený supernatant a vzniklá peleta byla resuspendována směsí pufru RLT (347 µl) a beta-mercaptoethanolu (3 µl). Vzniklá směs byla uchována při -80°C.

K izolaci RNA z plné periferní krve matky byl užíván mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, USA) a totožný protokol, jako při izolaci z placentární tkáně, pouze s tím rozdílem, že na začátku byla směs pelety buněk a RLT pufru rozmrazena při teplotě 37 °C po dobu 4 minut a dále bylo přidáno 600 µl pufru (Lysis/Binding Buffer). Po promíchání bylo ke směsi přidáno 95 µl Homogenate Additive a dále byl postup stejný. Eluovanou RNA bylo vzhledem k rychlému rozkladu nutné zpracovat bezprostředně po izolaci.

7.5. Měření koncentrace RNA

Čistota a koncentrace izolované RNA z placentární tkáně byla zjišťována pomocí spektrofotometru (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, USA). Měření probíhalo třikrát při objemu 1,5 µl pro každý vzorek. Vzorky byly následně ředěny na koncentraci 3 ng/µl vodou pro PCR (Ambion, Austin, USA). Čistotu vzorku odrážel příslušný poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm.

U vzorků z plné periferní krve byly výtěžky izolace natolik nízké, že nebylo možno měřit jejich koncentraci. Do následných analýz byla použita neředěná RNA.

7.6. Reverzní transkripce

Jednotlivé miRNA byly pomocí reverzní transkripce přepsány na komplementární DNA (dále již jen cDNA) s využitím TaqMan MicroRNA Assay obsahující specifické RT primery vlásenkového charakteru (stem-loop primery), (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) a TaqMan microRNA Reverse Transcription Kitu s využitím 7500 Real-Time PCR System (obojí Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 4. Reverzní transkripce probíhala v objemu 10 µl v jedné jamce, směs obsahovala 4,6 µl RT master mixu, 2 µl příslušného RT primeru a 3,4 µl vzorku.

Tabulka č. 4 Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Složení reakční směsi pro reverzní transkripci	
Komponenty	Objem na 1 jamku
Reverzní transkriptáza	0,7 µl
Inhibitor	0,1 µl
pufr	1 µl
dNTPs	0,1 µl
Voda	2,7 µl
Celkový objem RT master mixu	4,6 µl
RT primer	2 µl
RNA vzorek	3,4 µl
Celkový reakční objem	10 µl

Reverzní transkripce byla provedena na přístroji 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), teplotní profil shrnuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 5 Teplotní profil pro reverzní transkripci

Teplotní profil reverzní transkripce	
Čas (min)	Teplota (°C)
30	16
30	42
5	85
∞	4

Vzhledem k rychlé degradaci RNA byly vzorky izolované z plné periferní krve přepisovány bezprostředně po izolaci.

7.7. Kvantitativní PCR v reálném čase

Po přepisu RNA na cDNA reverzní transkripcí následovala detekce cílových miRNA pomocí kvantitativní PCR v reálném čase, díky níž lze přesně určit, jaké množství příslušné miRNA je ve vzorku přítomno (Walker N. J., 2001). V relativní kvantifikaci byly hodnoty genové exprese vyjádřeny vzhledem k endogenní (vnitřní) kontrole a referenčnímu vzorku (Schmittgen *et al.*, 2008).

Složení reakční směsi (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) pro detekci kardiovaskulárních miRNA je uvedeno v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6 Obsah reakční směsi pro kvantitativní PCR v reálném čase

Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR v reálném čase	
Komponenty	Objem na 1 jamku
TaqMan univerzální PCR master mix	10 μ l
Voda	5 μ l
TaqMan miRNA esej	1 μ l
Celkový reakční objem PCR master mixu	16 μ l
cDNA	4 μ l
Celkový reakční objem	20 μ l

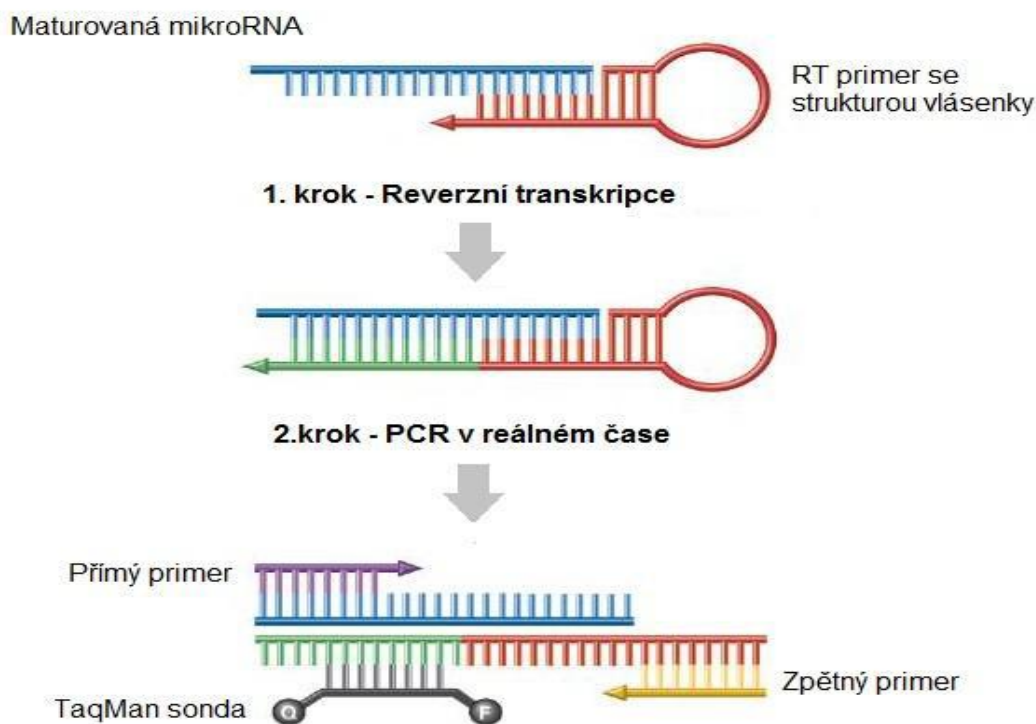
Součástí každé analýzy byla negativní kontrola vzorku, dále jen NTC, kdy byl vzorek nahrazen vodou, dále fyziologické vzorky od zdravých pacientek (FG), a vzorky patologických gravidit (PE, IUGR, GH). Analýza probíhala v 50 amplifikačních cyklech na 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Teplotní profil kvantitativní PCR v reálném čase zobrazuje tabulka č 7.

Tabulka č. 7 Teplotní profil kvantitativní PCR v reálném čase

Teplotní profil kvantitativní PCR v reálném čase	
Čas	Teplota (°C)
2 min	50
10 min	95
15 s	95
60 s	60

Expres každé miRNA byla stanovena pomocí komparativní Ct metody (Schmittgen and Livak, 2008) vždy vzhledem ke geometrickému průměru Ct hodnot vybraných endogenních kontrol s minimální variabilitou exprese mezi fyziologickými a patologickými vzorky (pro placentární tkáň U54 a RNU58A a pro plnou periferní krev

matek RNU58A a RNU38B). Byla využita kombinace kontrol vybraných na základě již zmíněných předchozích studií s využitím programu NormFinder (software ver. 0.953). Proces reverzní transkripce a kvantitativní PCR v reálném čase shrnuje obrázek č. 1.



Obr. č 1 Schéma kvantitativní PCR v reálném čase

Na miRNA (modře) se váže RT primer, na jehož 3'konci je sekvence nukleotidů komplementární k miRNA (červeně). Během reverzní transkripce se transformuje miRNA do cDNA (zeleně). Během PCR se používá přímý (fialově) a zpětný (žlutě) primer, TaqMan sonda (černá). V průběhu syntézy nového řetězce dochází k postupnému odbourání sondy, přičemž dochází k fluorescenci.

Upraveno dle: http://www.asuragenservices.com/images/taqman_miRNA_assay.gif (11. 2. 2014).

7.8. Analýza dat pomocí statistických metod

Normalita získaných dat byla zhodnocena pomocí Shapiro – Wilk testu, na jehož základě byl zjištěn nenormální charakter rozdělení dat, což vedlo k následnému využití neparametrických statistických testů. K analýze výsledků byl použit software Statistica (version 9.0; StatSoft, Inc., USA). Pro srovnání mezi dvěma skupinami byl použit Mann Whitney U-test a porovnání mezi více skupinami Kruskal – Wallis test. Statistická signifikace byla stanovena na základě p hodnoty, kde $p < 0,05$.

Pro výběr vhodných endogenních kontrol byla nejprve provedena studie jak na souboru placentárních tkání, tak na souboru z plných periferních krví matky. V obou případech byl testován soubor 19 krátkých RNA molekul, které jsou běžně užívány jako endogenní kontroly pro normalizaci dat genové exprese (RNU6B, RNU19, RNU24, RNU38B, RNU43, RNU44, RNU48, RNU49, RNU58A, RNU58B, RNU66, U6snRNA, U18, U47, U54, U75, HY3, RPL21, Z30), z nichž byly finálně vybrány dvě: RNU58A a U54 pro analýzu na placentární tkáň s hodnotou stability pro nejlepší dvojici genů 0,049 a RNU58A a RNU38B s hodnotou stability pro nejlepší dvojici genů 0,081 pro analýzu na plné periferní krvi matek. Výběr endogenních kontrol zobrazuje tabulka č. 8.

Tabulka č. 8 Vybrané endogenní kontroly pro normalizaci dat genové exprese miRNA, v závorkách jsou uvedené hodnoty stability příslušného genu v jednotlivých typech genetického materiálu (NormFinder software).

Zvolené endogenní kontroly (hodnota stability)	
Placentární tkáň	Periferní krev matky
RNU58A (0,072)	RNU58A (0,085)
U54 (0,073)	RNU38B (0,138)

Na základě výsledků hledání ve veřejných databázích a publikacích byly k testování na obou typech biologického materiálu vybrány následující kardiovaskulární miRNA: miR-1, miR-16, miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-33a, miR-92a, miR-100, miR-103, miR-122, miR-125b, miR-126,

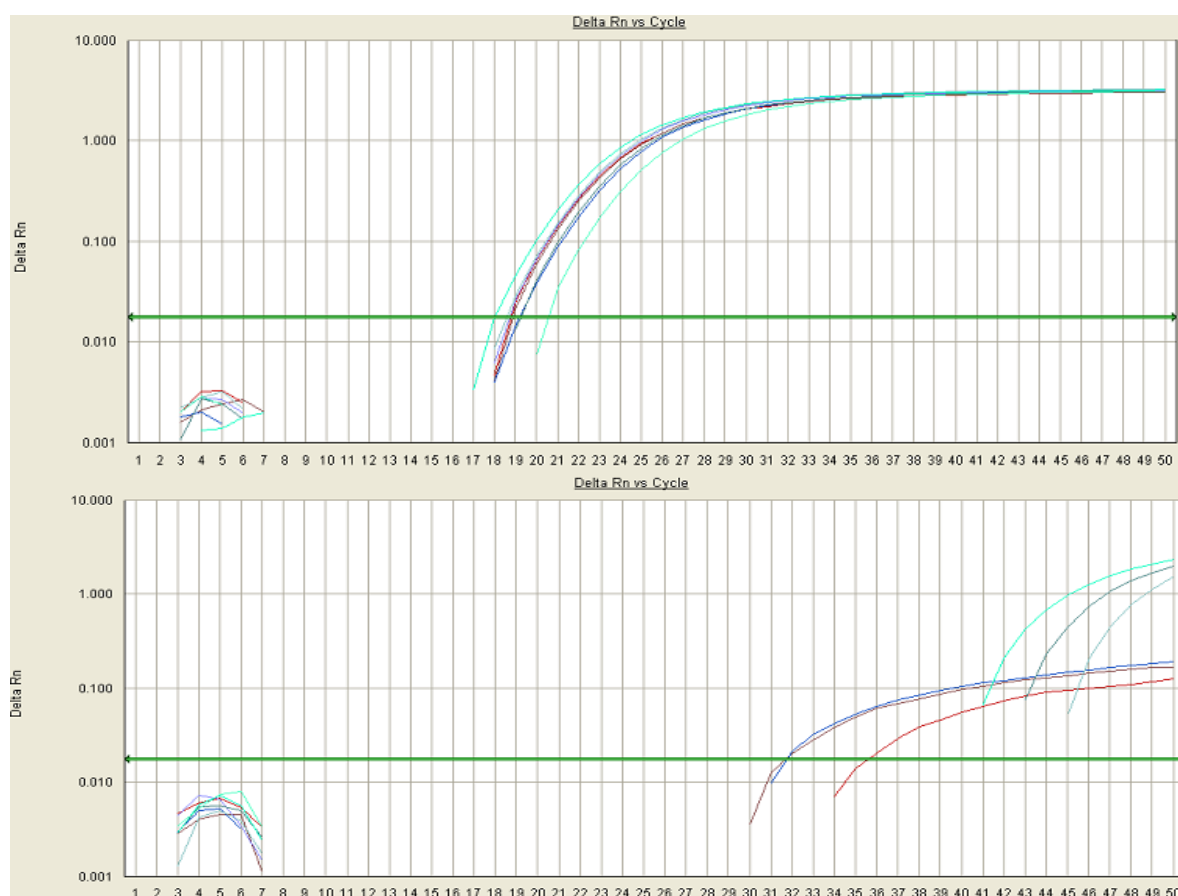
miR-130b, miR-133a, miR-143, miR-145, miR-146a, miR-155, miR-181a, miR-195, miR-199a, miR-208, miR-210, miR-221, miR-342-3p, miR-499, miR-574-3p.

Grafické znázornění výsledků je uvedeno v podobě boxplotů, kde ohraničená krabice znázorňuje rozložení mezi 25. a 75. percentilem, dále je znázorněno maximum a minimum neodlehých hodnot (3 a 97. percentil), odlehlé hodnoty (kroužek) a extrémní hodnoty (hvězdička). Osa y má upravené měřítko v korespondenci s rozložením dat pro danou proměnnou.

8. Výsledky

Z výše vyjmenovaných miRNA, které byly do studie zahrnuty, bylo nutné miR-33a a miR-208 na základě průběhu amplifikace (atypický tvar amplifikačních křivek, viz obrázek č. 2) vyřadit z dalšího výzkumu.

Obrázek č. 2 Ukázka amplifikačních křivek, nahoře – správný průběh genové exprese, dole - atypický průběh amplifikace.



Pro účely výzkumu byly analyzovány vzorky fyziologických gravidit a patologických gravidit, všechny z období třetího trimestru těhotenství (rozložení týdnů gravidity v souboru z placentární tkáně a plné krve matek shrnuje tabulka č. 9. Těhotenské komplikace, které byly předmětem výzkumu, zahrnovaly preeklapsii, gestační hypertenzi, intrauteriní růstovou retardaci a v několika případech jejich kombinace (PE+IUGR).

Tabulka č. 9 Srhnutí stádia gravidity všech analyzovaných vzorků.

	Týden gravidity			
	Placentární tkáň		PK matky	
	Fyziologická gravidita	Patologická gravidita	Fyziologická gravidita	Patologická gravidita
Rozmezí	37 - 41	28 - 41	35 - 36	28 - 41
Průměr	39,7	36,2	36	35,6
Medián	40	37	36	37

Před statistickou analýzou dat byly vyřazeny následující typy biologického materiálu v případech, kdy se klinická data pacientek lišila v době před a po ukončení studie:

- vzorky z vícečetné gravidity
- vzorky od pacientek s esenciální hypertenzí, kde není hypertenze primárně podmíněna těhotenstvím.
- vzorky pacientek s SGA, protože se nejedná o důsledek placentární insuficience.

8.1. Výsledky - placentární tkáň

Praktická část práce započala pilotní studií na 80 vzorcích v zastoupení 20 FG, 20 IUGR, 20 GH, 20 PE (tabulka č. 10), přičemž cílem bylo získat dostatečně velký soubor dat, aby mohla být vybrána optimální kombinace endogenních kontrol pro normalizaci dat genové exprese miRNA pomocí softwaru NormFinder. Jako nejlepší dvojice byla vybrána kombinace RNU58A a U54, která byla využita pro všechny následující analýzy této části projektu.

Tabulka č. 10 Přehled počtu použitých vzorků k výběru endogenních kontrol pro normalizaci dat genové exprese miRNA v případě placentární tkáně

Počet vzorků pro výběr endogenních kontrol	
Diagnóza	Počet vzorků
Fyziologická gravidita (FG)	20
Intrauterinní růstová retardace (IUGR)	20
Gestační hypertenze (GH)	20
Preeklampsie (PE)	20
Celkem	80

Po vybrání vhodných endogenních kontrol následoval samotný projekt zjišťující genovou expresi kardiovaskulárních miRNA, jenž obsahoval v první fázi výzkumu základní soubor 80 vzorků placent z oblasti centrálního kotyledonu, přičemž zastoupení testovaných diagnóz bylo také 20 FG, 20 IUGR, 20 GH, 20 PE.

Na úrovni základního souboru byla prokázána up-regulace u některých ze 30 kardiovaskulárních miRNA ve vzorcích GH a PE. Toto zjištění vedlo k navýšení souboru o další vzorky PE, neboť PE není na rozdíl od GH heterogenní skupinou (liší se dle závažnosti onemocnění). Následovala detailnější statistická analýza dat.

U vzorků s PE bylo cílem zaměřit se na srovnání exprese kardiovaskulárních miRNA mezi mírnou a závažnou formou preeklampsie, dále mezi těhotenstvími vyžadující ukončení gravidity před 34. týdnem těhotenství a porodem po 34. týdnu těhotenství. Také byl sledován rozdíl mezi preeklampií nasedající na předchozí gestační hypertenzi (superponovaná forma) a preeklampií bez předchozí hypertenze (nesuperponovaná forma). Po navýšení počtu vzorků byla velikost a rozložení souboru následující: 20 FG, 20 IUGR, 20 GH, 67 PE – z toho 29 mírná PE, 38 závažná PE, 21 porod před 34. týdnem těhotenství a 46 porod po 34. týdnu těhotenství; 20 PE s předchozí gestační hypertenzí a 47 bez předchozí gestační hypertenze. Velikost a rozložení souboru po navýšení zobrazuje tabulka č. 11. Rozdělení podskupin v souboru vzorků s PE zobrazuje tabulka č. 12.

Tabulka č. 11 Počty zpracovaných vzorků z placentární tkáně pro detekci a kvantifikaci genové exprese kardiovaskulárních miRNA

Počet zpracovaných vzorků z placentárních tkání	
Diagnóza	Počet vzorků
Fyziologická gravidita (FG)	20
Intrauterinní růstová retardace (IUGR)	20
Gestační hypertenze (GH)	20
Preeklampsie (PE)	67
Celkem	127

Tabulka č. 12 Charakteristika pacientek s preeklampií

Pacientky s preeklampií	
Preeklampsie	Počet
Forma onemocnění	
<i>mírná</i>	29
<i>závažná</i>	38
Ukončení gravidity	
<i>porod před 34. týdnem gravidity</i>	21
<i>porod po 34. týdnu gravidity</i>	46
Výskyt předchozí gestační hypertenze	
<i>PE nasedající na GH</i>	20
<i>PE bez předchozí GH</i>	47

U diagnózy IUGR nebyl v expresi kardiovaskulární miRNA nalezen žádný statisticky významný rozdíl v porovnání s fyziologickými graviditami.

Bylo prokázáno, že mnohé z testovaných kardiovaskulárních miRNA mají silný vztah zejména ke gestační hypertenzi. Čtyři miRNA, konkrétně miR-16, miR-17, miR-20a a miR-26a ukazují trend k up-regulaci u GH (tj. při navýšení počtu vzorků by

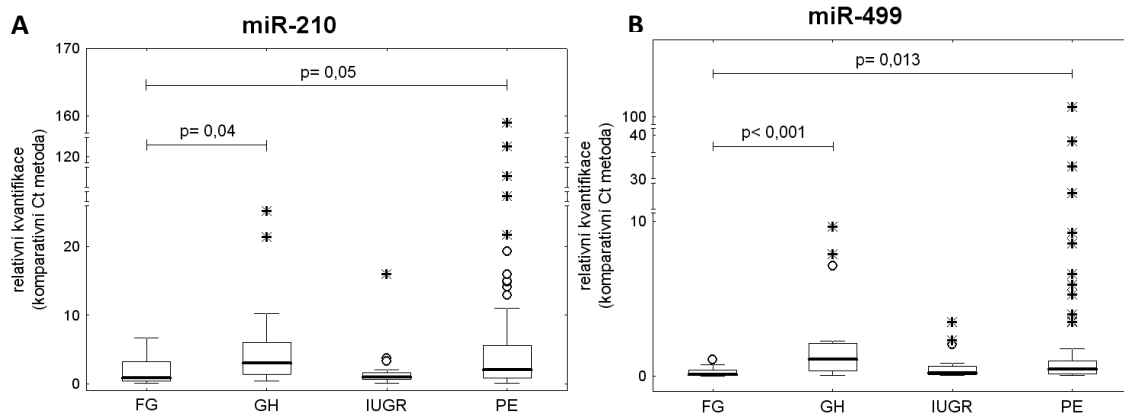
pravděpodobně prokázaly statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami). Dalších patnáct miRNA bylo up-regulovaných u GH v porovnání s FG: miR-1, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100, miR-126, miR-130b, miR-133a, miR-143, miR-146a, miR-155, miR-181a, miR-210, miR-499a, miR-574-3p. Vzhledem k zaměření projektu, zejména na těhotenské komplikace s placentární insuficiencí, jsou grafy znázorňující statistickou významnost pro GH uvedeny v příloze.

Významné výsledky přineslo srovnání exprese kardiovaskulárních miRNA u PE vůči FG. Byly potvrzeny některé markery z předešlých studií, a byl objeven jeden nový marker. MiR-1, miR-20a a miR-155 jsou up-regulovány u PE vyskytující se po 34. týdnu těhotenství, v případě miR-17 u PE manifestující se po 34. týdnu dosáhly zvýšené hodnoty téměř statistické signifikance. MiR-210 je up-regulována u závažné formy PE a taktéž u PE po 34. týdnu, dále se projevuje trend up-regulace v případě náhlé PE bez předchozího výskytu gestační hypertenze. Konečně miR-499, která zaznamenává zvýšenou expresi celkově u PE, u mírné i závažné formy PE, u onsetů po 34. týdnu gravidity a je zvýšená u superponované formy PE i u PE bez předchozího výskytu gestační hypertenze. Statisticky signifikantní výsledky zobrazují grafy č. 1 - 4. Míru exprese a statistickou významnost testovaných kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni shrnuje tabulka č. 13.

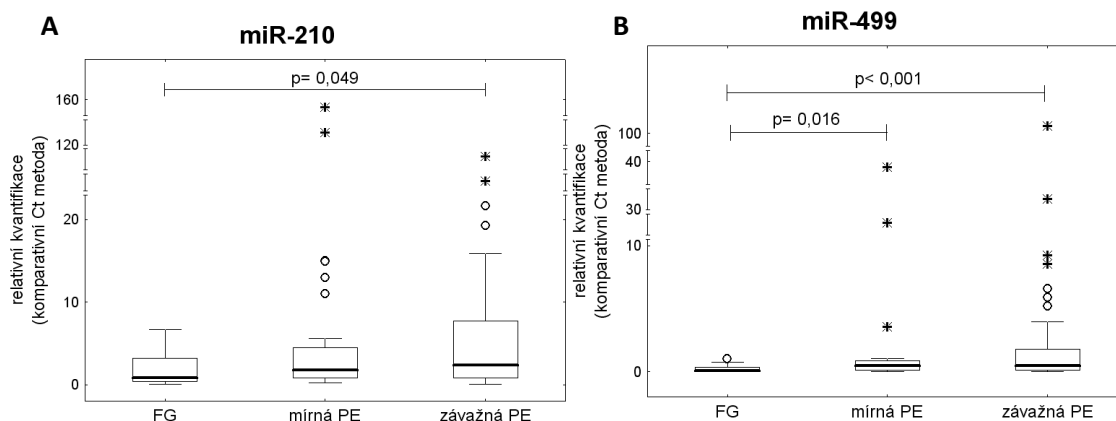
Tabulka č. 13 Shrnutí statisticky signifikantních výsledků genové exprese kardiovaskulárních miRNA na souboru vzorků získaných z placentární tkáně. Šipky značí up-regulaci genové exprese, T značí trend up-regulace a hodnoty v závorkách vyjadřují *p* hodnotu, na jejímž základě byla určena statistická významnost výsledku.

Kardiovaskulární miRNA	Těhotenské komplikace								
	FGR	GH	PE	mírná PE	závažná PE	porod před 34. tt	porod po 34. tt	superponovaná	nesuperponovaná
miR-1		↑ (0,013)					↑ (0,036)		
miR-16		T ↑ (0,069)							
miR-17		T ↑ (0,072)					T ↑ (0,082)		
miR-20a		T ↑ (0,067)					↑ (0,042)		
miR-20b									
miR-21		↑ (0,049)							
miR-23a		↑ (0,014)							
miR-24		↑ (0,015)							
miR-26a		T ↑ (0,080)							
miR-29a									
miR-92a									
miR-100		↑ (0,017)							
miR-103									
miR-125b									
miR-126		↑ (0,054)							
miR-130b		↑ (0,047)							
miR-133a		↑ (0,050)							
miR-143		↑ (0,026)							
miR-145									
miR-146a		↑ (0,010)							
miR-155		↑ (0,023)					↑ (0,050)		
miR-181a		↑ (0,036)							
miR-195									
miR-199a									
miR-210		↑ (0,040)	↑ (0,050)		↑ (0,049)		↑ (0,012)		T ↑ (0,060)
miR-221									
miR-342-3p									
miR-499		↑ (<0,001)	↑ (0,013)	↑ (0,016)	↑ (0,001)		↑ (<0,001)	↑ (0,029)	↑ (0,001)
miR-574-3p		↑ (0,031)							

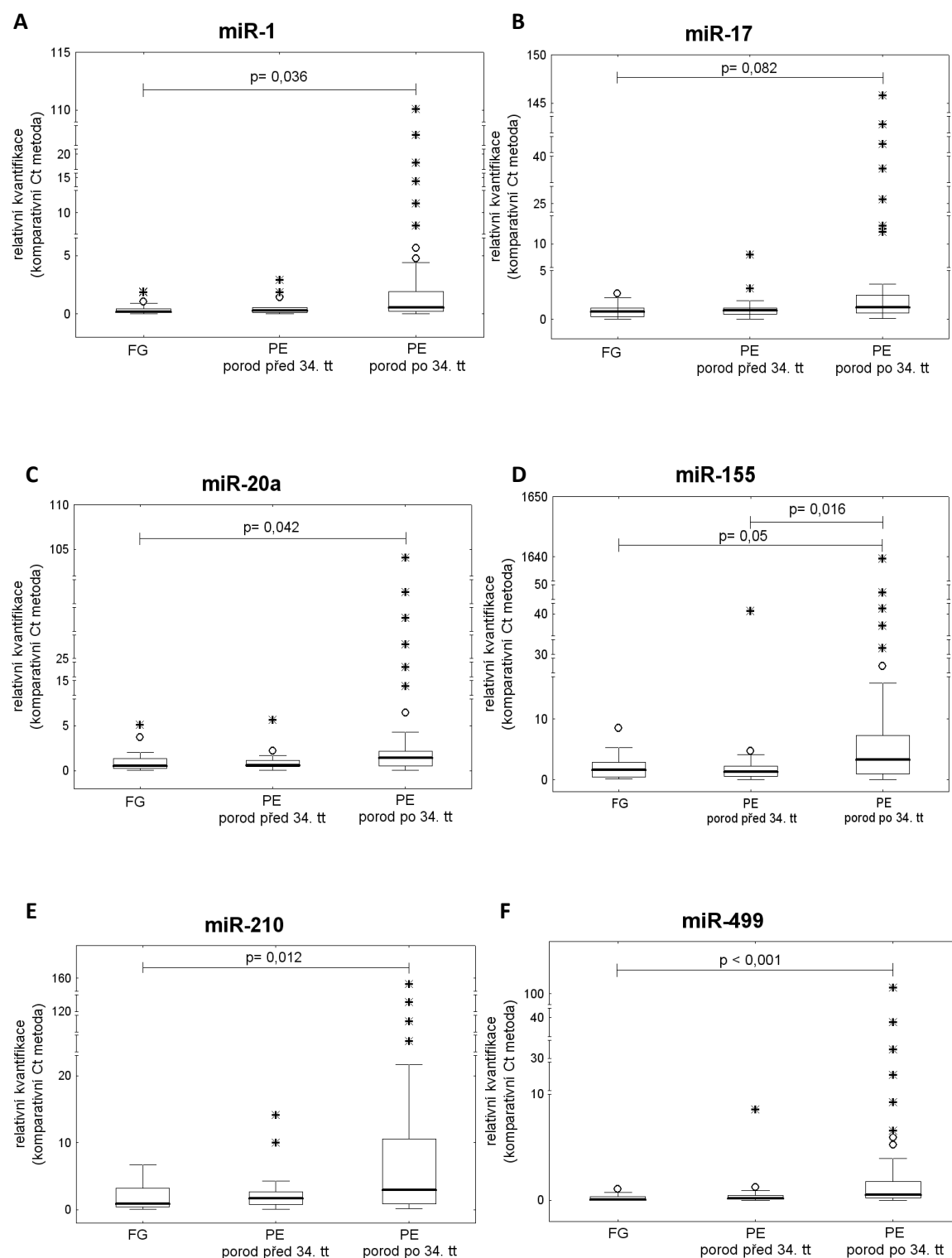
Grafy č. 1 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni. Skupinová analýza genové exprese mezi jednotlivými diagnózami. A-B



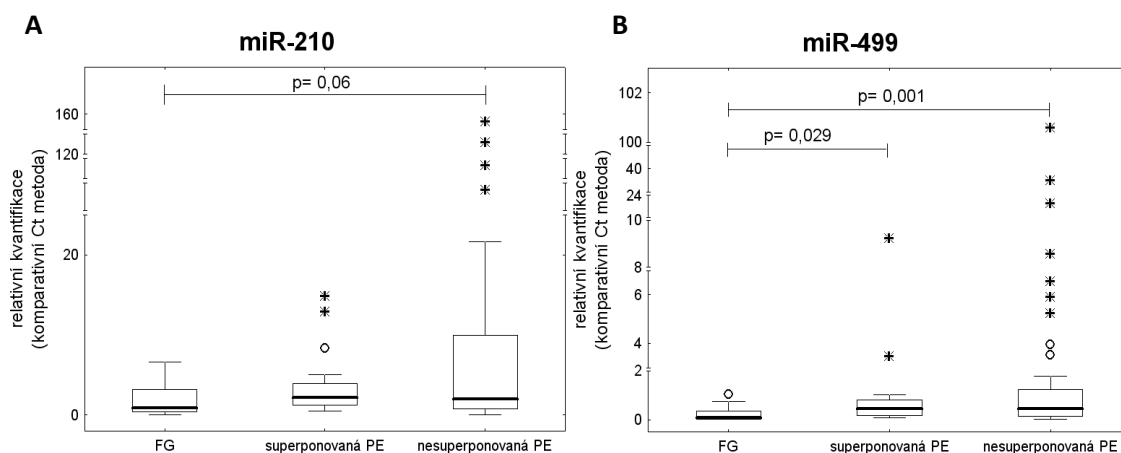
Grafy č. 2 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni. Rozdíl genové exprese mezi jednotlivými formami PE s ohledem na závažnost onemocnění. A-B



Grafy č. 3 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni. Rozdíl genové exprese u pacientek s PE s ohledem na požadavek na ukončení gravidity (před a po 34. týdnu těhotenství). A-F



Grafy č. 4 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni. Rozdíl v genové expresi u pacientek s PE s ohledem na výskyt předchozí gestační hypertenze. A-B



8.2. Výsledky – plná periferní krev matky

Druhá fáze výzkumu, zabývající se detekcí kardiovaskulárních miRNA v plné periferní krvi matky, probíhala podobně jako na souboru z placentární tkáně. V první řadě byla provedena pilotní studie na souboru 76 vzorků (20 FG, 21 PE, 15 IUGR a 20 GH), kterou popisuje tabulka č. 14. Na zmíněném souboru bylo otestováno 19 endogenních kontrol pro následnou normalizaci dat genové exprese miRNA. Na základě výsledků pilotní studie byla vybrána optimální dvojice endogenních kontrol (RNU58A a RNU38B).

Tabulka č. 14 Soubor zpracovaných vzorků z plné periferní krve matky v pilotní studii k výběru endogenních kontrol pro normalizaci dat genové exprese miRNA

Počet vzorků periferní krve pro výběr endogenních kontrol	
Diagnóza	Počet vzorků
Fyziologická gravidita (FG)	20
Intrauterinní růstová retardace (IUGR)	15
Gestační hypertenze (GH)	20
Preeklampsie (PE)	21
Celkem	76

Po výběru endogenních kontrol následoval výzkum detekce míry genové exprese kardiovaskulárních miRNA v plné periferní krvi matky, jenž obsahoval 80 vzorků (20 FG, 20 PE, 20 GH, 20 IUGR), viz tabulka č. 15. Vybrané vzorky byly otestovány na 34 kardiovaskulárních miRNA, včetně dvou vybraných endogenních kontrol. MiR-122 a miR-155 byly z důvodu atypického průběhu amplifikačních křivek ze studie na plné periferní krvi matky vyřazeny, podobně jako již v předchozí studii byly vyřazeny miR-33a a miR-208. Výsledky studie byly získány na 28 kardiovaskulárních miRNA.

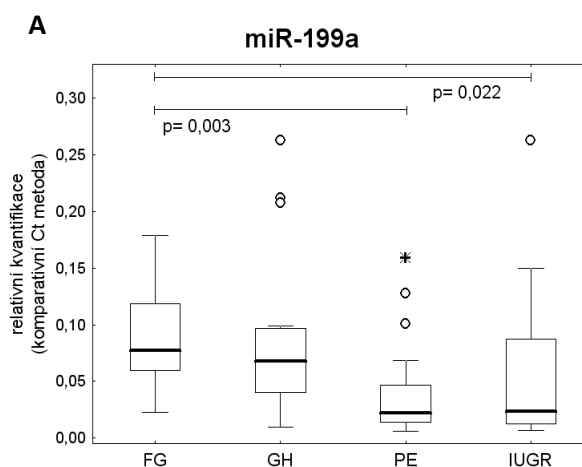
Tabulka č. 15 Počty zpracovaných vzorků z plné periferní krve matky

Počet zpracovaných vzorků z PK matky	
Diagnóza	Počet vzorků
Fyziologická gravidita (FG)	20
Intrauterinní růstová retardace (IUGR)	20
Gestační hypertenze (GH)	20
Preeklampsie (PE)	20
Celkem	80

V případě GH nebyl v porovnání s FG nalezen v tomto souboru žádný statisticky signifikantní rozdíl pro žádnou z testovaných kardiovaskulárních miRNA.

Jako marker pro IUGR byla nově identifikována miR-199a, která byla v porovnání s FG v případě IUGR silně down-regulována (graf č. 5). Jiné miRNA však nepřinesly významné výsledky v případě IUGR z plné periferní krve matky.

Graf č. 5A Genová exprese miR-199a v plné periferní krvi matky (skupinová analýza).

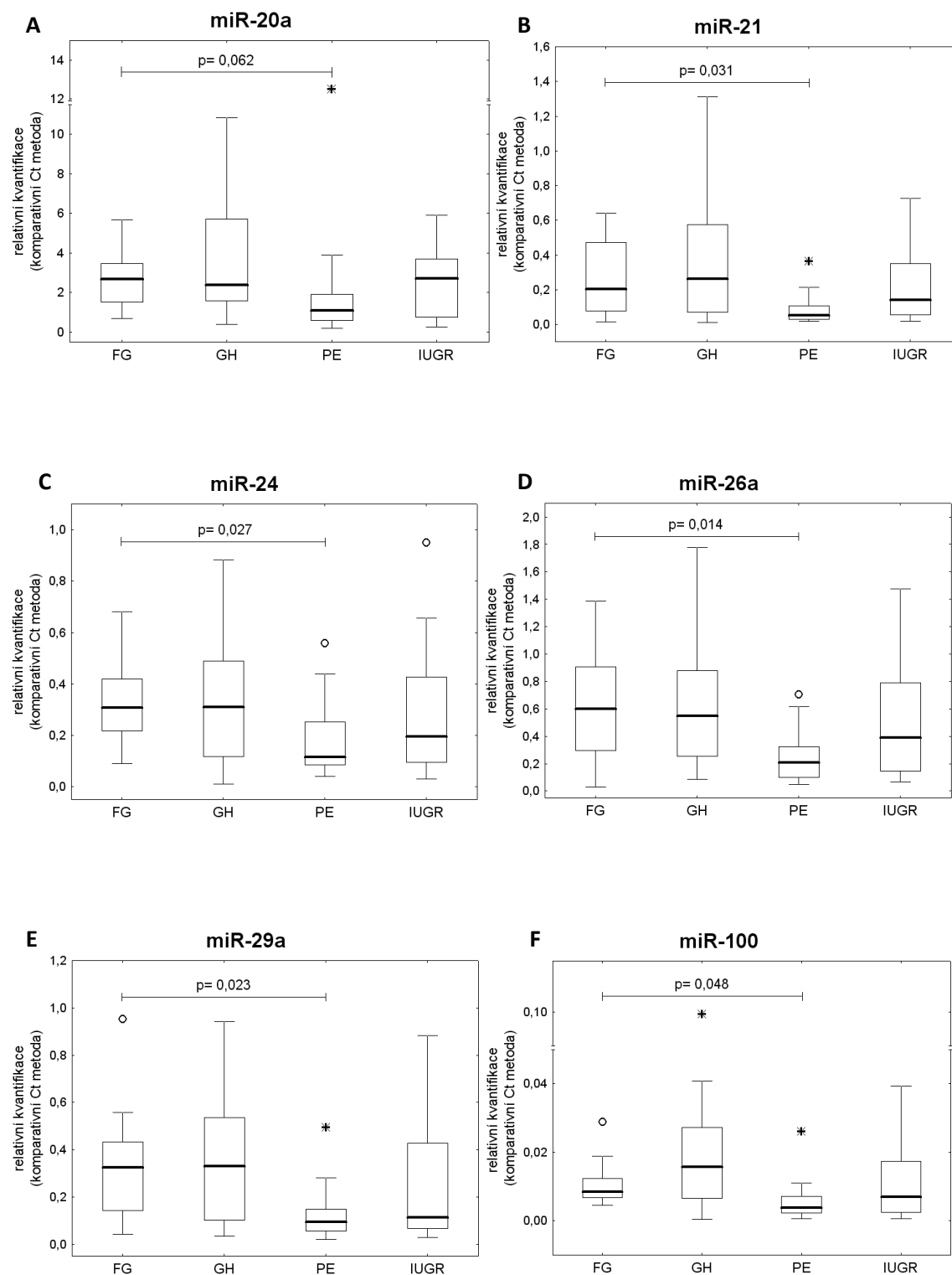


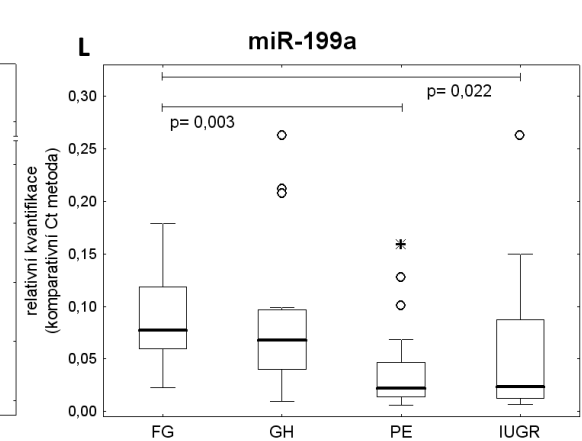
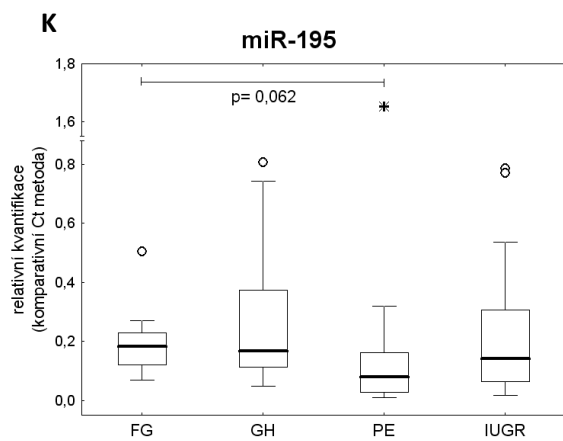
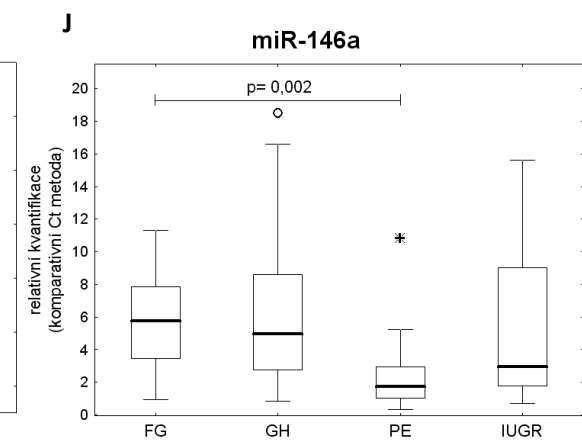
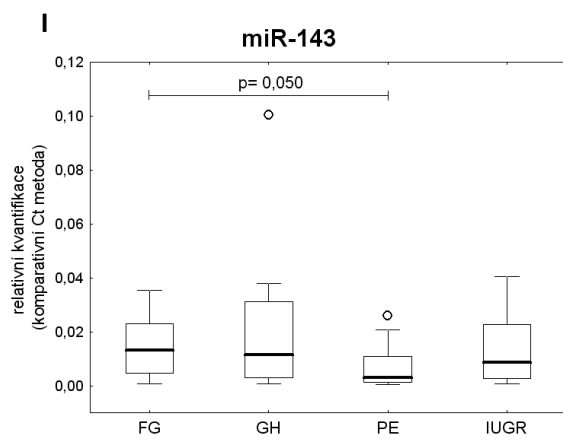
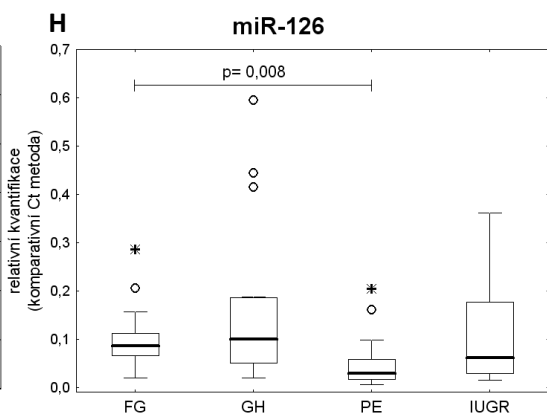
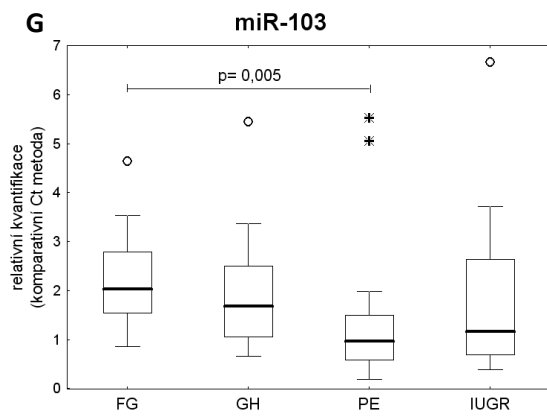
V případě PE bylo identifikováno několik kardiovaskulárních miRNA, které se projevují v plné PK matky sníženými hladinami ve srovnání s FG. Konkrétně jsou to: miR-21, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-100, miR-103, miR-126, miR-143, miR-146a, miR-199a, miR-221, miR-342-3p, miR-574-3p. Další tři miRNA ukazují trend down-regulace v plné PK matek s PE: miR-20a, miR-195, miR-499. Výsledky studie na plné periferní krvi matky shrnuje tabulka č. 16 a grafy č. 6. Vzhledem k nižšímu počtu vzorků v souboru nebylo možné provést analýzu na podskupinách PE, jako tomu bylo u vzorků z placentární tkáně. V blízké době toto rozšíření souboru proběhne, nebude však již předmětem této diplomové práce. Studii v této fázi je proto nutné považovat pouze jako pilotní, která bude dále rozpracována, a která tudíž v současné podobě poskytuje pouze orientační výsledky, které určí směr dalšího výzkumu.

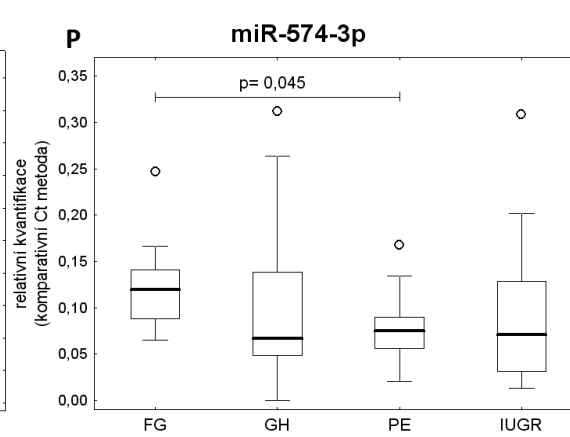
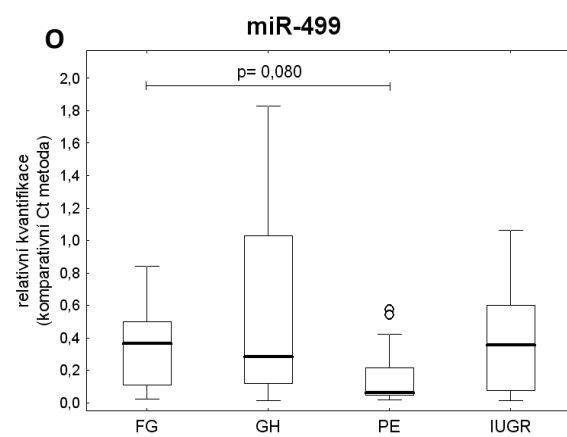
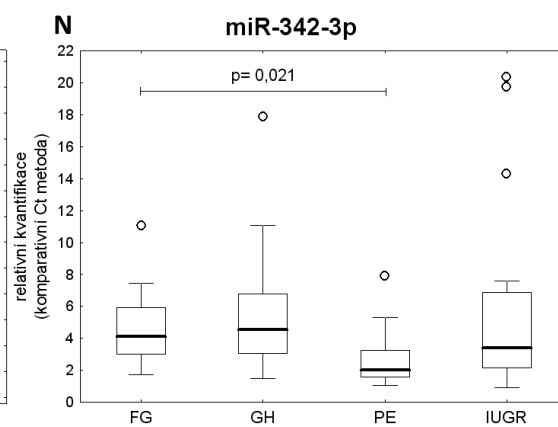
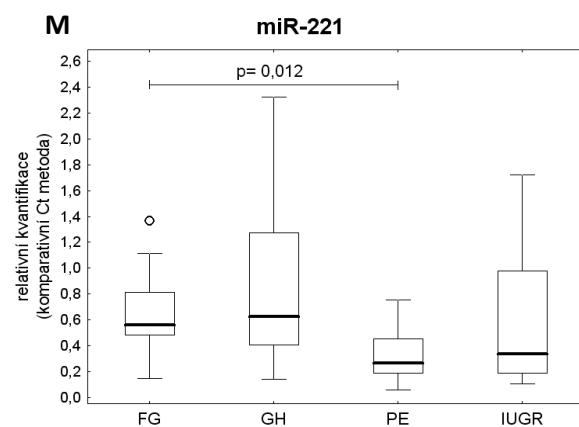
Tabulka č. 16 Shrnutí statisticky signifikantních výsledků exprese kardiovaskulárních miRNA na souboru vzorků plné periferní krve matek. Šipky značí down-regulaci genové exprese, T značí trend na down-regulaci a hodnoty v závorkách vyjadřují *p* hodnotu, na jejímž základě byla určena statistická významnost výsledku.

Kardiovaskulární miRNA	Těhotenské komplikace		
	IUGR	GH	PE
miR-1			
miR-16			
miR-17			
miR-20a			<i>T</i> ↓ (0,062)
miR-20b			
miR-21			↓ (0,031)
miR-23a			
miR-24			↓ (0,027)
miR-26a			↓ (0,014)
miR-29a			↓ (0,023)
miR-92a			
miR-100			↓ (0,048)
miR-103			↓ (0,005)
miR-125b			
miR-126			↓ (0,008)
miR-130b			
miR-133a			
miR-143			↓ (0,050)
miR-145			
miR-146a			↓ (0,002)
miR-181a			
miR-195			<i>T</i> ↓ (0,062)
miR-199a	↓ (0,022)		↓ (0,003)
miR-210			
miR-221			↓ (0,012)
miR-342-3p			↓ (0,021)
miR-499			<i>T</i> ↓ (0,084)
miR-574-3p			↓ (0,045)

Grafy č. 6 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v plné periferní krvi matek (skupinová analýza). A-P







9. Diskuze

Ve výsledcích na vzorcích z placentární tkáně lze míru exprese kardiovaskulárních miRNA mezi PE a FG dobře porovnat s předchozími studiemi, které se tímto vztahem již zabývaly. Výsledky některých předchozích studií můžeme potvrdit, zatímco jiné na základě naší práce potvrdit nelze.

V případě miR-1 byla u PE vyskytující se po 34. týdnu těhotenství v této práci prokázána up-regulace, ovšem Enquobahrie a jeho tým prokázali naopak down-regulaci miR-1 v placentární tkáni u PE vyskytující se po 34. týdnu gravidity (Enquobahrie *et al.*, 2011). U miR-17 byl identifikován trend zvyšování hladin u PE manifestující se po 34. týdnu těhotenství, zatímco v předchozí studii byla zjištěna up-regulace u závažné formy PE (Wang *et al.*, 2012), kterou jsme v naší studii nepozorovali. U PE s onsetem po 34. týdnu těhotenství byly pozorovány zvýšené hladiny i u miR-20a, což může podpořit výsledky studie Ishibashi a kol., kteří uvádějí up-regulaci u PE bez bližší specifikace (Ishibashi *et al.*, 2012), ale ne výsledky studie Wang a kol. (2012), který zjistil up-regulaci miR-20a u závažné PE. Podobně tomu je u miR-20b, kde jsme nepotvrdili up-regulaci u závažné formy PE, kterou pozoroval Wang a kol. (2012). Dále jsme nepozorovali up-regulaci miR-21 u závažné formy PE, kterou popisuje Noack a kol. (2011). Potvrzujeme však výsledky studie Pineles *et al.* (2007), a to up-regulaci miR-155 u PE s manifestací po 34. týdnu těhotenství. Zvýšení exprese miR-181a u závažné formy PE popsal Hu a kol. (2009), což však naše studie nepotvrdila. Na druhou stranu jsou výsledky naší studie v souladu se studiemi Zhu a kol. (2009), Mayor-Lynn a kol. (2011), Enquobahrie a kol. (2011), Ishibashi a kol. (2012), a to v případě up-regulace miR-210 u závažné formy PE a u PE s manifestací po 34. týdnu těhotenství. Naše studie identifikovala nový marker ze skupiny kardiovaskulárních miRNA, miR-499, který je up-regulován u PE jako takové, u obou jejích forem (závažné i mírné), u PE jak s předchozím, tak bez předchozího výskytu gestační hypertenze a také u PE s manifestací po 34. týdnu těhotenství. Byl nově popsán vztah miR-499 k těhotenským komplikacím (PE, GH).

Dosud nebyly rovněž publikovány žádné studie, které by se zabývaly detekcí genové exprese kardiovaskulárních miRNA v plné periferní krvi matky, je tudíž obtížné

srovnávat výsledky této práce s jinými výsledky. Ovšem pokud provedeme srovnání výsledků genové exprese kardiovaskulárních miRNA na placentární tkáni a plné periferní krvi matek, lze tvrdit, že ačkoliv v placentární tkáni byly miRNA spíše up-regulované, v plné periferní krvi matek je tomu naopak a genová exprese kardiovaskulárních miRNA je spíše down-regulovaná (miR-21, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-100, miR-103, miR-126, miR-143, miR-146a, miR-199a, miR-221, miR-342-3p, miR-574-3p; trend down-regulace: miR-20a, miR-195, miR-499 pro PE v plné krvi matek). Zároveň je pozoruhodné, že placenta reaguje ve větší míře na přítomnost gestační hypertenze, zatímco plná PK matek prakticky vůbec. Naopak placenta s výjimkou miR-210 a miR-499 prakticky nereflexuje přítomnost preeklampsie, ale plná periferní krev matky, potažmo organismus matky, na PE reaguje, konkrétně sníženou genovou expresí většiny kardiovaskulárních miRNA. Rozdíly v genové expresi mezi placentární tkání a periferní krví matky shrnuje tabulka č. 17. Souhrn všech *p* hodnot získaných testováním profilu genové exprese kardiovaskulárních miRNA na obou typech biologického materiálu je uveden v souhrnné tabulce v příloze práce.

Vztahem genové exprese kardiovaskulárních miRNA a IUGR se předchozí studie nezabývaly. Byl popsán pouze vztah k FGR, popřípadě SGA a genové exprese kardiovaskulárních miRNA: down-regulace miR-16, miR-21 a miR-146a u těhotenství s SGA v placentární tkáni (Maccani *et al.*, 2011). Naše studie nenalezla dysregulace kardiovaskulárních miRNA ve skupině IUGR v placentární tkáni. V případě plné PK matek byla zjištěna down-regulace miR-199a jako jediné u skupiny vzorků s IUGR.

Tabulka č. 17 Shrnutí genové exprese kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni (placenta) a plné periferní krvi matky (krev). Šipky značí dle směru up- či down-regulaci genové exprese testovaných kardiovaskulárních miRNA, kurzíva značí trend a hodnoty vyjadřují *p* hodnotu, na jejímž základě byla určena statistická významnost výsledku.

Kardiovaskulární miRNA	Těhotenské komplikace											
	IUGR		GH		PE		mírná PE	závažná PE	porod před 34. tt	porod po 34. tt	superponovaná	nesuperponovaná
	placenta	krev	placenta	krev	placenta	krev						
miR-1			↑ 0,013							↑ 0,036		
miR-16			↑ 0,07									
miR-17			↑ 0,072							↑ 0,082		
miR-20a			↑ 0,067			↓ 0,062				↑ 0,042		
miR-20b												
miR-21			↑ 0,049			↓ 0,031						
miR-23a			↑ 0,014									
miR-24			↑ 0,015			↓ 0,027						
miR-26a			↑ 0,087			↓ 0,014						
miR-29a						↓ 0,023						
miR-92a												
miR-100			↑ 0,017			↓ 0,048						
miR-103						↓ 0,005						
miR-122												
miR-125b												
miR-126			↑ 0,054			↓ 0,008						
miR-130b			↑ 0,047									
miR-133a			↑ 0,05									
miR-143			↑ 0,026			↓ 0,05						
miR-145												
miR-146a			↑ 0,01			↓ 0,002						
miR-155			↑ 0,023							↑ 0,05		
miR-181a			↑ 0,036									
miR-195						↓ 0,062						
miR-199a		↓ 0,022				↓ 0,003						
miR-210			↑ 0,04		↑ 0,05			↑ 0,049		↑ 0,012		↑ 0,06
miR-221						↓ 0,012						
miR-342-3p						↓ 0,021						
miR-499			↑ < 0,001		↑ 0,013	↓ 0,08	↑ 0,016	↑ 0,001		↑ < 0,001	↑ 0,029	↑ 0,001
miR-574-3p			↑ 0,031			↓ 0,045						

Je nezbytné navýšit soubor vzorků plné PK matek o různé formy PE a na něm testovat vztah genové exprese kardiovaskulárních miRNA k závažnosti onemocnění a k předchozímu výskytu gestační hypertenze. Poznatky, které by taková studie poskytla, by měly již takovou relevanci, že by na jejich základě bylo možné určit, které konkrétní kardiovaskulární miRNA jsou dysregulované u jednotlivých těhotenských komplikací.

Právě dysregulované kardiovaskulární miRNA během komplikovaného těhotenství jsou rizikovým faktorem predisponujícím k pozdějšímu možnému výskytu kardiovaskulárních onemocnění u matek a jejich dětí, které se narodily z patologického průběhu těhotenství. V organismu matky může v důsledku těhotenství s komplikacemi dojít rozvinutí kardiovaskulárních chorob, jak bylo popsáno výše. Hypertenze v těhotenství vyvolává dlouhodobé metabolické a cévní abnormality, které mohou zvýšit celkové riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění (Libby *et al.*, 2007; Männistö *et al.*, 2013). Gestační hypertenze a její důsledky mohou být základním faktorem pro rozvoj ischemické choroby srdeční, mozkové mrtvice, srdečního selhání a onemocnění žil (Bellamy *et al.*, 2007; Craici *et al.*, 2008; Männistö *et al.*, 2013).

Děti narozené z patologických gravidit mají několikanásobně vyšší riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění již od dětského věku. Dětská obezita, diabetes mellitus a hypertenze jsou nejčastějšími dlouhodobými důsledky podvýživy plodu v těhotenství způsobené placentární insuficiencí (Libby *et al.*, 2007).

Tento specifický rizikový profil matek a dětí by mohl sloužit jako indikátor pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění před jejich klinickou manifestací. Zahájení preventivních opatření by bylo možné v případě dětí již od nízkého věku a v případě matek záhy po ukončení těhotenství s komplikovaným průběhem.

10. Závěr

Naše studie potvrdila přítomnost většiny vybraných kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni a plné periferní krvi matky. Zároveň byla porovnána míra jejich genové exprese mezi jednotlivými diagnózami. Výjimku tvořily miR-33a a miR-208, a dále pak miR-122 a miR-155, které v placentární tkáni a/nebo plné PK matek vykazovaly atypický průběh amplifikačních křivek.

Bylo identifikováno několik miRNA, které se u pacientek s těhotenskými komplikacemi vyskytují ve větším množství v placentární tkáni. Rozdíly v genové expresi několika kardiovaskulárních miRNA (up-regulace u PE: miR-1, miR-17, miR-20a, miR-155, miR-210, miR-499) byly mezi skupinou pacientek s fyziologickou graviditou a pacientek s preeklampií v případě placentární tkáně statisticky signifikantní, tj. na hladině významnosti $p < 0,05$. Rozdíl v expresi kardiovaskulárních miRNA ve vzorcích z placentární tkáně byl dále statisticky významný mezi pacientkami s gestační hypertenzí a pacientkami s normálním průběhem těhotenství (up-regulace u GH: miR-1, miR-16, miR-17, miR-20a, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-26a, miR-100, miR-126, miR-130b, miR-133a, miR-143, miR-146a, miR-155, miR-181a, miR-210, miR-499, miR-574-3p). Nebyla nalezena statistická významnost v rozdílu genové exprese vybraných kardiovaskulárních miRNA mezi normálním průběhem těhotenství a těhotenstvím s intrauterinní růstovou retardací na souboru vzorků získaných z placentární tkáně.

Rozdíl v genové expresi kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni u různých forem PE byl nalezen u miR-210 (up-regulace u závažné formy PE) a miR-499 (up-regulace u mírné i závažné formy PE). V případě PE manifestující se po 34. týdnu těhotenství byly v placentární tkáni up-regulovány tyto miRNA: miR-1, miR-17 (trend k up-regulaci), miR-20a, miR-155, miR-210, miR-499. Zvýšené hladiny kardiovaskulárních miRNA byly dále zjištěny v placentární tkáni u superponované PE (miR-499) a u nesuperponované PE (miR-210 a miR-499).

Soubor periferních krví matek poskytl zcela odlišné výsledky. Žádná z testovaných kardiovaskulárních miRNA nebyla dysregulována u GH v plné PK matek.

Ve vztahu k IUGR byla v porovnání s FG down-regulována jediná miRNA, konkrétně miR-199a. Třináct miRNA (miR-21, miR-24, miR-26a, miR-29a, miR-100, miR-103, miR-126, miR-143, miR-146a, miR-199a, miR-221, miR-342-3p, miR-574-3p) bylo down-regulovaných u PE bez bližší specifikace, u tří miRNA byly zachycen trend k down-regulaci pro PE bez bližší specifikace: miR-20a, miR-195 a miR-499. Jak bylo již zmíněno, soubor nebyl dostatečně velký pro rozdělení PE do podskupin, jako tomu bylo u projektu na placentární tkáni. Rozšíření souboru bude cílem dalšího výzkumu, který již není předmětem této diplomové práce.

Zjišťování míry genové exprese v periferní krvi matky nebylo dosud předmětem žádné studie. Bylo tedy nutné upravit pro tyto účely všechny protokoly pro proces analýzy na tomto typu biologického materiálu. Ačkoliv není možné získané výsledky konfrontovat s výsledky z jiných pracovišť, přinesla tato studie zcela jedinečná data, která budou v budoucnu předmětem výzkumu v tomto oboru.

Shrneme-li to, bylo popsáno několik významných biologických markerů, část z nich dokonce zcela nově, jež mají vztah ke kardiovaskulárnímu systému a zároveň hrají roli v patogenezi těhotenských komplikací. Dysregulace konkrétních kardiovaskulárních miRNA je klíčová pro popsání vztahu těhotenských komplikací k riziku pozdějšího vývoje kardiovaskulárních chorob jak u matky, tak u dítěte narozeného z patologické gravidity. Pokračování výzkumu na periferní žilní krvi matky pomůže identifikovat některé kardiovaskulární miRNA jako biologické markery konkrétních těhotenských komplikací a tím umožní nastolení preventivních programů u osob s rizikem pozdějšího rozvoje kardiovaskulárních chorob.

Seznam literatury

1. ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists 77(1):67.
2. ACOG Committee opinion no. 548: weight gain during pregnancy 2013. American College of Obstetricians and Gynecologists 121(1):210.
3. ACOG Committee opinion no. 134: fetal growth restriction. American Journal of Obstetrics and Gynecology 121(5):1122-1133
4. Artlett CM. 2005. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. Clinica Chimica Acta 360:1-8.
5. Bamfo JE, Odibo AO. 2011. Diagnosis and management of fetal growth restriction, Journal of Pregnancy 2011
6. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and fiction. Cell 116:281-287.
7. Baschat AA, Galan HL, Bhide A, Berg C, Kush ML, Oepkes D, Harman CR. 2006. Doppler and biophysical assessment in growth restricted fetuses: distribution of test results. Ultrasound in obstetrics and gynecology, 27(1):41-47.
8. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. 2007. Preeclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. British Medical Journal 335(7627):974.
9. Berks D, Hoedjes M, Raat H, Duvekot JJ, Steegers EA, Habbema JD. 2013. Risk of cardiovascular disease after pre-eclampsia and the effect of lifestyle interventions: a literature-based study. An International Journal of Obstetrics and Gynaecology 120(8):924-931.
10. Bianchi DW. 2004. Circulating Fetal DNA: Its origin and Diagnostic Potential – A review. Placenta 25(18):93-101.
11. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber APOD. 1997. PCR quantitation of Fetal Cells of Maternal Blood in Normal and Aneuploid Pregnancies. The American Journal of Human Genetics 61:822-829.

12. Bonamy AK, Parikh NI, Cnattingius S, Ludvigsson JF, Ingelsson E. 2011. Birth characteristics and subsequent risks of maternal cardiovascular disease: effects of gestational age and fetal growth. *Circulation* 124:2839-2846.
13. Borna S, Neamatipoor E, Radman N. 2012. Risk of coronary artery disease in women with history of pregnancies complicated by preeclampsia and LBW. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 25(7):1114-1116.
14. Collares CVA, Evangelista AF, Xavier DJ, Rassi DM, Arns T, Foss-Freitas MC, Foss MC, Puthier D, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Donadi EA. 2013. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *Biomed Central* 6:491.
15. Craici IM, Wagner SJ, Hayman SR, Garovic VD. 2008. Pre-eclamptic pregnancies: an opportunity to identify women at risk for future cardiovascular disease. *Future Medicine Ltd – Women's Health* 4(2):133-135.
16. Crocker IP, Tansinda DM, Baker PN. 2004. Altered cell kinetics in cultured placental villous explants in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Journal of Pathology* 204:11-18.
17. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggiolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC. 2010. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal* 31(22):2765-2773.
18. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. 2013. A Panel of 4 microRNAs Facilitates the Prediction of Left Ventricular Contractility after Acute Myocardial Infarction. *PloS one* 8(8):e70644
19. Devor EJ, Santillan DA, Santillan MK. 2013. Preeclampsia and MicroRNAs. *Proceedings in Obstetrics and Gynecology* 3(1):1-10.
20. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. 1999. Preeclampsia Is Associated with Widespread Apoptosis of Placental Cytotrophoblasts within the Uterine Wall. *American Journal of Pathology* 155(1):293-301.

21. Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. 2013. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *European Journal of Heart Failure* 15(10):1138-1147.
22. Empel VPM, De Windt LJ, Da Costa Martins PA. 2012. Circulating miRNAs: Reflecting or Affecting Cardiovascular Disease? *Current Hypertension Reports* 14:498-509.
23. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, and Williams MA. 2011. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 204(2):178.e112-121.
24. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. 2010. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation Research* 107(5):677-684.
25. Fisher SJ. 2004. The placental problem: Linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:53.
26. Freibert SM, Mannino DM, Bush H, Crofford LJ. 2011. The association of adverse pregnancy events and cardiovascular disease in women 50 years vage and older. *Journal od Womens Health* 20(2):287-293.
27. Garovic VD, Hayman SROV. 2007. Hypertension in pregnancy: an emerging risk factor for cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice Nephrology* 3(11):613-622.
28. Genbacev O, DiFederico E, McMaster M, Fisher SJ. 1999. Invasive cytotrophoblast apoptosis in pre-edampsia. *Human Reproduction* 14(2):59-66.
29. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Götlberg M, Erlinge D. 2011. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patiens with ST elevation myocardial infarction, are selectivelz dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology* 118:217-226.

30. Go ATJI, van Vugt JMG, Oudejans CBM. 2010. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Human Reproduction Update* 3:372-382.
31. Gunel T, Zeybek ZG, Akçakaya P, Kalelioğlu I, Benian A, Ermis H, Aydın K. 2011. Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genetics and Molecular Research* 10(4):4034-4040.
32. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 105:1516-1521.
33. Haukkamaa L, Moilanen L, Kattainen A, Luoto R, Kahonen M, Leinonen M, Jula A, Kesäniemi YA, Kaaja R. 2009. Pre-eclampsia is a risk factor of carotid artery atherosclerosis. *Cerebrovascular Diseases*. 27(6):599-607.
34. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Masuzaki H. 2013. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Journal of Prenatal Diagnosis* 33(3):214-222.
35. Hromadníková I, Kotlabová K, Doucha J, Dlouha K, Krofta L. 2012. Absolute and relative quantification of placenta-specific microRNAs in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. *Journal of Molecular Diagnostics* 14(2):160-167.
36. Hromadníková I, Kotlabová K, Ondráčková M, Kestlerová A, Novotná V, Hympanova L, Doucha J, Krofta L. 2013. Circulating C19MC microRNAs in preeclampsia, gestational hypertension and fetal growth restriction. *Mediators of inflammation* 2013.
37. Hromadníková I, Kotlabová K, Jirásek J E, Doucha J. 2010. Detection of placenta-specific microRNAs in maternal circulation. *Česká gynekologie/Česká lékařská společnost J. Ev. Purkyně*, 75(3): 252-256.
38. Hu Y, Li P, Hao S, Liu L, Zhao J, and Hou Y. 2009. Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47(8):923-929.

39. Hulsmans M, Sinnaeve P, Van der Schueren B, Mathieu Ch, Janssens S, Holvoet P. 2012. Decreased miR-181a Expression in Monocytes of Obese Patients is Associated with the Occurrence of Metabolic Syndrome and Coronary Artery Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97(7):1213-1218.
40. Hung ECV, Chiu RWK, Lo YM. 2009. Detection of circulating fetal nucleic acids: a review of methods and applications. *Journal of Clinical Pathology* 62:308-313.
41. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33(20):179.
42. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma, *Clinical Chemistry Journal* 54(3):482-490.
43. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics* 31(3):367-373.
44. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M. 2012. Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* 59(2):265-273.
45. Kharazmi E, Dossus L, Rohrmann S, Kaaks R. 2011. Pregnancy loss and risk of cardiovascular disease: a prospective population – based cohort study (EPIC – Heidelberg). *Heart* (97)1:49-54.
46. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L, Zhao J, Zhao L. 2011. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetologica* 48(1):61-69.
47. Klonisch T, Drouin R. 2009. Fetal – maternal exchange of multipotent stem/progenitor cells: microchimerism in diagnosis and disease. *Cell Press – Molecular Medicine* 15(11):510-518.

48. Kotlabova K, Doucha J, and Hromadnikova I. 2011. Placental-specific microRNA in maternal circulation--identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *Journal of Reproductive Immunology* 89(2):185-191.
49. Lai EC. 2002. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics* 30(4):363-364.
50. Liang Y, Ridzon D, Wong L, and Chen C. 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8:166.
51. Libby G, Murphy DJ, McEwan NF, Greene SA, Forsyth JS, Chien PW, Morris AD. 2007. Pre-eclampsia and the later development of type 2 diabetes in mothers and their children: an intergenerational study from the Walker cohort. *Diabetologia* 50(3):523-530.
52. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 350(9076):485-487.
53. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. 1998. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *The New England Journal of Medicine* 339(24):1734-1738.
54. Lykke JA, Langhoff – Ross J, Sibai BM, Funai EF, Triche EW, Paidas MJ. 2009. Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension* 53(6):944-951.
55. Lykke JA, Paidas MJ, Triche EW, Langhoff – Ross J. 2012. Fetal growth and later maternal dech, cardiovascular disease and diabetes. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* (91)4:503-510.
56. Maccani MA, Avissar-Whiting M, Banister CE, McGonnigal B, Padbury JF, Marsit CJ. 2010. Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21 and miR-146a in the placenta. *Epigenetics* 5(7):583-589.

57. Maccani MA, Padbury JF, Marsit CJ 2011. MiR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PLoS One* 6(6): e21210
58. Männistö T, Mendola P, Vääräsmäki M, Järvelin MR, Hartikainen AL, Pouta A, Suvanto E. 2013. Elevated blood pressure in pregnancy and subsequent chronic disease risk. *Circulation* 127(6):681-690.
59. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, and Chegini N. 2011. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Journal of Human Reproduction Science* 18(1):46-56.
60. McDonald SD, Ray J, Teo K, Jung H, Salehian O, Yusuf S, Lonn E. 2013. Measures of cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis in a cohort of women with a remote history of preeclampsia. *Atherosclerosis* 229(1):234-239.
61. Noack F, Ribbat-Idel J, Thorns C, Chiriac A, Axt-Flidner R, Diedrich K, Feller AC. 2011. MiRNA expression profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded placental tissue samples from pregnancies with severe preeclampsia. *Journal of Perinatal Medicine* 39(3):267-271.
62. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 104:1604-1609.
63. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, Draghici S, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P *et al.* 2007. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 196(3):261.e261-266.
64. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G. 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108:3068-3071.
65. Rayner KJ, Moore KJ. 2012. The plaque “micro” environment: microRNAs control the risk and the development of atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* 14:413-421.
66. Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T. 2011.

- miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 219(1):211-217.
67. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Barshack I. 2008. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature Biotechnology* 26(4):462-469.
 68. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analysing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature protocols* 3(6):1101-1108.
 69. Staszal T, Zapala B, Polus A, Sadakierska-Chudy A, Kieć-Wilk B, Stepień E, Wybrańska I, Chojnacka M, Dembińska-Kieć A. 2011. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 121(10):361-367.
 70. Sucharov C, Bristow MR, Port JD. 2008. MiRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45(2):185-192.
 71. Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular Research* 79:581-588.
 72. Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli GP. 2008. Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension* 52(5):873-880.
 73. Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, Melillo G, Rigolini R, Costa E, Crea F, Capogrossi MC, Napolitano M, Martelli F. 2010. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiological Genomics* 42(3):420-426.
 74. Walker NJ. 2001. Real-Time and Quantitative PCR: Applications to Mechanism-Based Toxicology. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology* 15(3):121-127.
 75. Wang X. 2008. MiRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* 14(6):1012-1017.
 76. Wang YS, Wang HY, Liao YC, Tsai PC, Chen KC, Cheng HY, Lin RT, Juo SH. 2012. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovascular Research* 95:517-526.

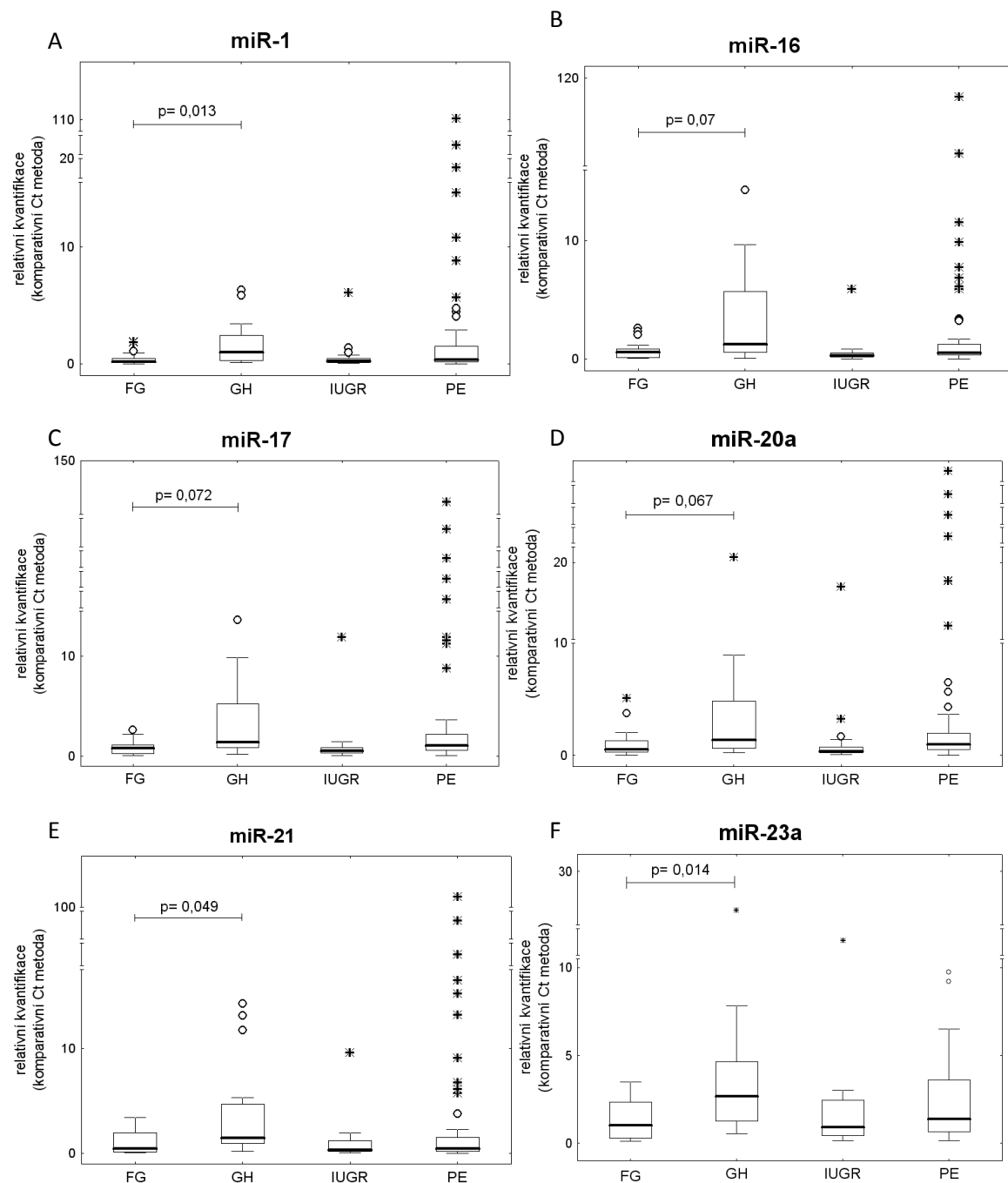
77. Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C, Schober A. 2013. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis?. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 33:449-454.
78. WHO 1988. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 158(1):80-83
79. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, and Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 11(3):228-234.
80. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. 2010. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Research* 107(6):810-817.
81. Zhao H, Guan J, Lee HM, Sui Y, He L, Siu JJ, Tse PP, Tong PC, Lai FM, Chan JC 2010. Up-regulated pancreatic tissue microRNA-375 associates with human type 2 diabetes through β -cell deficit and islet amyloid deposition. *Pancreas* 39: 843-46.
82. Zhou B, Li C, Qi W, Zhang Y, Zhang F, Wu JX, Hu YN, Wu DM, Liu , Yan TT, Jing Q, Liu MF, Zhai QW. 2012. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia* 55:2032-2043.
83. Zhu XM, Han T, Sargent IL, Yin GW, and Yao YQ. 2009. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 200(6):661-667.

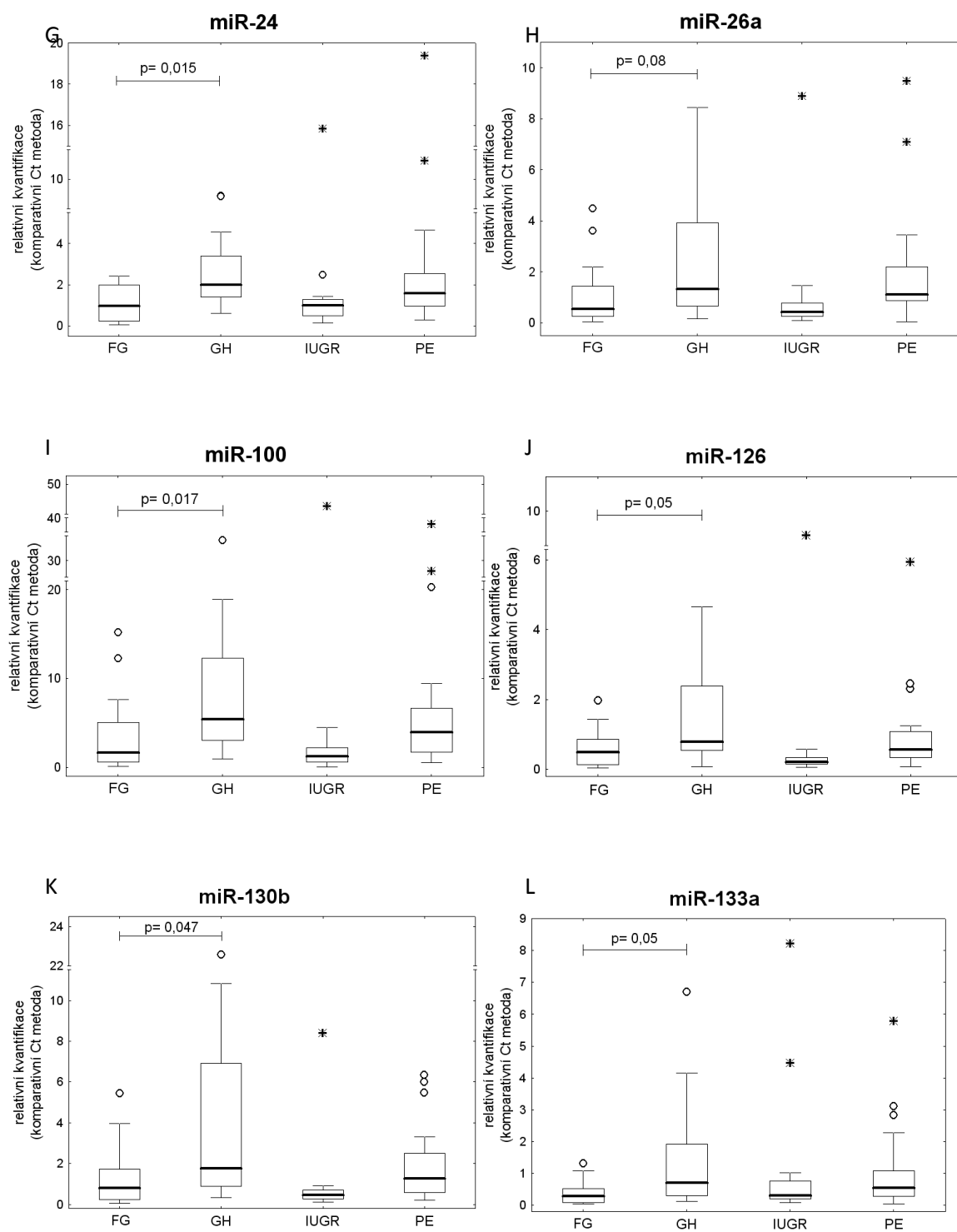
Internetové zdroje

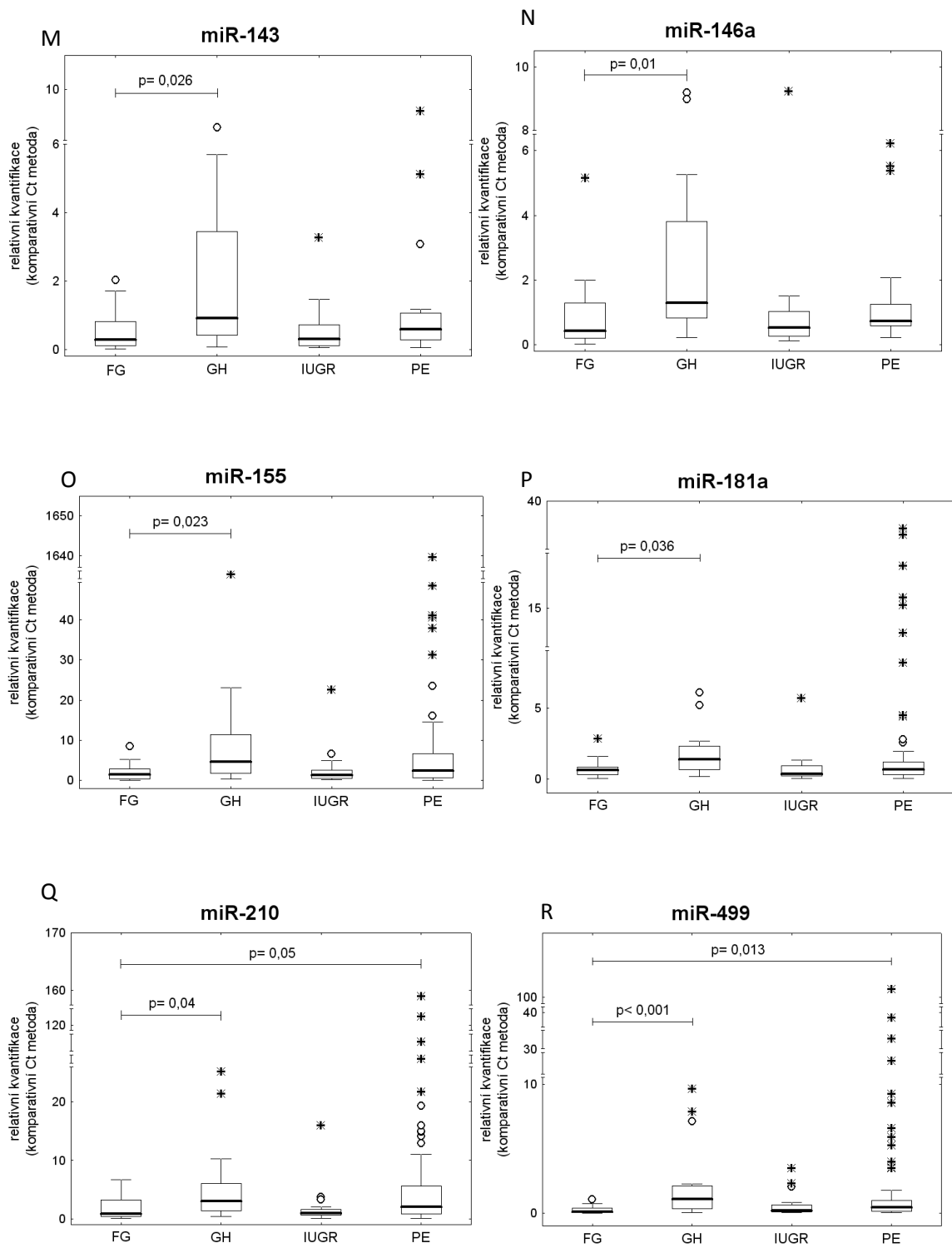
1. MicroRNA.org - Targets and Expression [online]. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>
2. MiRBase: the microRNA database [online]. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://mirbase.org/>
3. Nature publishing Group, Published online 2012 [online]. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://genetics.nature.com>
4. WHO [online]. [cit. 2014-03-21]. Dostupné z: <http://www.who.int/publications/guidelines/child health/en/>
5. Asuragen – Genomic Services [online]. [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: http://www.asuragenservices.com/images/taqman_miRNA_assay.gif

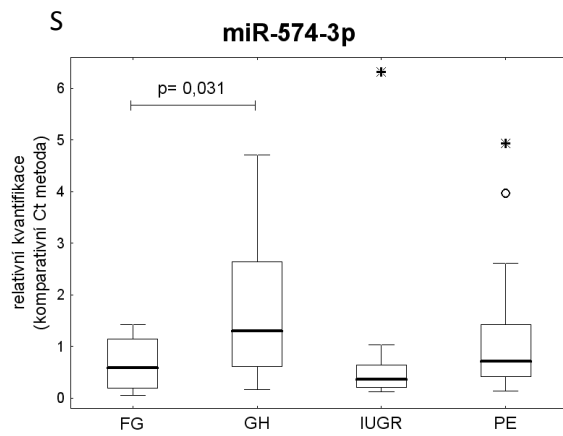
Přílohy

Grafy 1 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v placentární tkáni (skupinová analýza). A-S









Tabulka č. 1 Souhrn *p* hodnot získaných testováním profilu genové exprese kardiovaskulárních miRNA na obou typech biologického materiálu – placentární tkáň (placenta) a plná periferní žilní krev matky (krev). Statisticky signifikantní hodnoty (testované na hladině významnosti $p = 0,05$ jsou znázorněny tučně, trend navíc kurzívou.

Kardiovaskulární miRNA	Těhotenské komplikace											
	IUGR		GH		PE		mírná PE	závažná PE	porod před 34. tt	porod po 34. tt	superponovaná	nesuperponovaná
	placenta	krev	placenta	krev	placenta	krev	placenta					
miR-1	1	1	↑0,013	1	1	0,687	0,351	0,11	1	↑0,036	0,166	0,2
miR-16	0,858	0,565	↑0,07	1	1	1	1	0,932	1	0,322	1	1
miR-17	1	1	↑0,072	1	1	0,168	0,825	0,109	1	↑0,082	0,223	0,339
miR-20a	1	1	↑0,067	1	0,709	↓0,062	0,532	0,141	1	↑0,042	0,266	0,263
miR-20b	1	1	0,373	1	1	1	0,66	0,103	0,869	0,113	0,13	0,346
miR-21	1	1	↑0,049	1	1	↓0,031	1	1	0,34	0,605	1	1
miR-23a	1	1	↑0,014	1	0,765	0,615						
miR-24	1	0,907	↑0,015	1	0,206	↓0,027						
miR-26a	1	1	↑0,087	1	0,151	↓0,014						
miR-29a	1	1	0,224	1	0,305	↓0,023						
miR-92a	1	1	0,133	1	0,124	1						
miR-100	1	1	↑0,017	1	0,305	↓0,048						
miR-103	0,806	0,21	0,623	1	1	↓0,005						
miR-122	1		0,411		0,324		0,658	1	0,911	0,142	0,486	1
miR-125b	0,448	0,785	1	1	0,65	0,136						
miR-126	0,978	1	↑0,054	1	0,839	↓0,008						
miR-130b	0,765	1	↑0,047	1	0,93	1						
miR-133a	1	1	↑0,05	1	0,26	1						
miR-143	1	1	↑0,026	1	0,978	↓0,05						
miR-145	1	1	0,116	1	1	1						
miR-146a	1	1	↑0,01	1	0,641	↓0,002						
miR-155	1		↑0,023		0,35		0,198	0,88	1	↑0,05	0,394	0,528
miR-181a	1	1	↑0,036	1	1	1	1	0,488	1	0,443	0,888	0,997
miR-195	0,383	1	0,471	1	1	↓0,062	1	1	0,978	0,561	1	1
miR-199a	1	↓0,022	0,932	1	1	↓0,003	0,565	0,644	0,151	0,14	0,094	1
miR-210	1	1	↑0,04	1	↑0,05	1	0,125	↑0,049	0,862	↑0,012	0,111	↑0,06
miR-221	1	0,496	0,093	1	1	↓0,012						
miR-342-3p	1	1	0,103	1	0,131	↓0,021						
miR-499	0,575	1	↑< 0,001	1	↑0,013	↓0,08	↑0,016	↑0,001	0,729	↑< 0,001	↑0,029	↑0,001
miR-574-3p	1	0,124	↑0,031	0,368	0,839	↓0,045						